

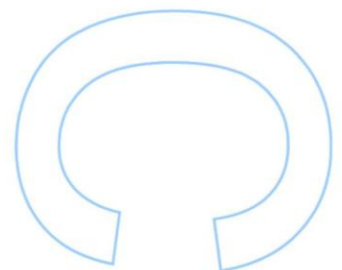
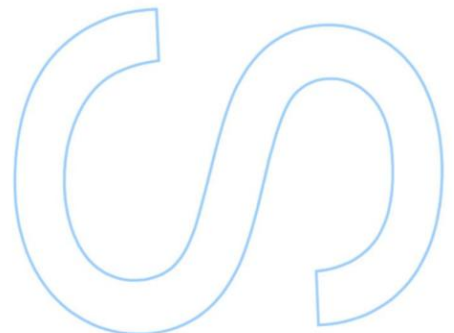
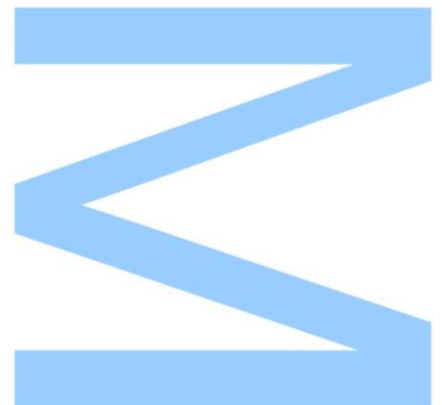
Impacto da técnica de *array*-CGH na avaliação genética de doentes com diagnóstico de atraso mental

Ana Patrícia Miranda Costa

Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2015

Orientador

Professora Doutora Sofia Dória, Professora Auxiliar,
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto



U. PORTO

FMUP FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

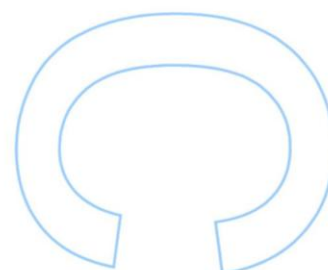
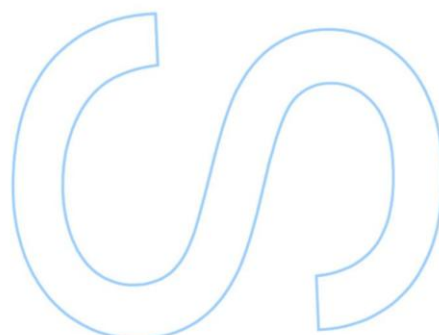
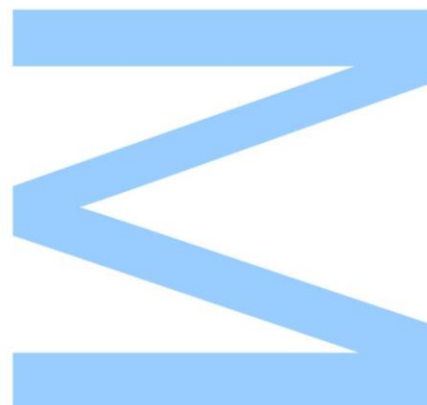
U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Durante a realização deste trabalho, foram várias as pessoas que me apoiaram e às quais agradeço.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, ao seu diretor Professor Doutor Alberto Barros, por ter autorizado o meu estágio e a todos os funcionários que me acolheram e me apoiaram durante o estágio e a realização desta tese.

Em especial, agradeço à minha orientadora, a Professora Doutora Sofia Dória, pelo voto de confiança, orientação, apoio e conhecimento transmitido. Agradeço também pela ajuda em todas as dúvidas que me surgiram durante este ano.

Aos meus colegas do M:BCM por estes dois anos de trabalho, mas também de muita diversão, união e companheirismo.

Às minhas amigas, Sofia, Ana, Diana, Bárbara e Helena, que durante estes cinco anos foram um apoio essencial para mim. Obrigada por toda a amizade e por terem sempre um ombro amigo à disposição.

Ao Tiago, por estar sempre ao meu lado e por me mostrar uma visão mais otimista de todos os problemas.

Aos meus pais e ao meu irmão, por fazerem de mim quem sou, por tornarem tudo isto possível e por serem um porto de abrigo com que posso sempre contar.

Índice

Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xiii
Resumo	1
Abstract	2
Capítulo I Introdução	3
Introdução geral	3
A citogenética clássica	4
A citogenética molecular	6
A técnica de <i>array-CGH</i>	8
O atraso mental	10
As causas do atraso mental	11
As CNVs – variantes comuns da população e variantes patogénicas	13
O estudo genético do atraso mental por <i>array-CGH</i> – a identificação de CNVs e a sua interpretação	14
Capítulo II Objetivos	17
Capítulo III Metodologia	19
Obtenção e preparação das amostras biológicas	19
Extração de DNA a partir de sangue periférico	19
<i>Array-CGH</i> e deteção de CNVs	20
Quantificação do DNA	20
Preparação das amostras	20
Marcação do DNA	20
Purificação do DNA marcado	21
Hibridação	21
Lavagens	22
Análise dos resultados	22
Validação dos resultados e estudo genético de familiares por qPCR	23
Preparação das amostras	24
Desenho da experiência	24
Configuração do <i>software</i>	25
Preparação das reações	25
Corrida das reações	26
Análise dos resultados	26
Interpretação da patogenicidade das CNVs	26

Capítulo IV Resultados e Discussão	29
Caso 1	30
Caso 2	34
Caso 3	37
Caso 4	38
Caso 5	40
Caso 6	41
Caso 7	42
Caso 8	45
Caso 9	48
Caso 10	50
Caso 11	54
Caso 12	56
Caso 13	59
Caso 14	61
Caso 15	63
Alterações provavelmente patogénicas (II)	65
Caso 16	65
Caso 17	67
Caso 18	69
Caso 19	71
Caso 20	73
Caso 21	76
Caso 22	78
Caso 23	80
Casos 24 e 25	81
Caso 26	83
Capítulo V Conclusões	87
Capítulo VI Referências Bibliográficas	89
Anexos	109

Lista de Figuras

Figura 1 – Exemplo de cariótipo de linfócitos com padrão de bandas de alta resolução de um indivíduo do sexo feminino (46, XX) (Imagem cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto).....	5
Figura 2 – Exemplo de uma translocação entre o cromossoma 15 e o cromossoma 9, identificada por FISH. Neste caso foram utilizadas três sondas: a CEP15 (azul) que marca o centrómero do cromossoma 15, a Tel15q que marca a região telomérica do cromossoma 15 (vermelho) e a LPT9q que marca a região telomérica do cromossoma 9 (verde). Observa-se que o cromossoma identificado como der15 possui o centrómero do cromossoma 15, mas contém a região telomérica do cromossoma 9, enquanto que o cromossoma der9 possui a região telomérica do cromossoma 15. Alteração identificada como t(9;15) (q22.3;q26.3) (Imagem cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto).....	7
Figura 3 – Esquematização da técnica de <i>array-CGH</i> . O DNA do paciente e DNA controlo são marcados com corantes fluorescentes e aplicados no <i>array</i> , onde hibridizam competitivamente com as sondas representativas do genoma humano. Os resultados da hibridação são analisados por um <i>software</i> , através de um <i>scanner</i> que capta a intensidade da fluorescência. As diferenças na hibridação indicam ganho ou perda de DNA (Adaptado de Kharbanda et al. ¹).	9
Figura 4 – Exemplo de um perfil de <i>array-CGH</i> de um paciente com atraso mental. O perfil indica uma deleção no braço curto do cromossoma 16; na imagem ampliada do lado direito é possível observar os genes que estão incluídos na região deletada (Imagem cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto).	10
Figura 5 – Resultado do <i>array-CGH</i> no caso 1, demonstrando a deleção na região 6q25.3 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	30
Figura 6 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene <i>ARID1B</i> determinadas no paciente 1 e na sua mãe, relativamente aos controlos feminino e masculino.	32
Figura 7 – Resultado do <i>array-CGH</i> no caso 1, demonstrando a deleção na região 9p24.3 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	33
Figura 8 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene <i>KANK1</i> determinadas no paciente 1 e na sua mãe, relativamente aos controlos feminino e masculino.	34
Figura 9 – Resultado do <i>array-CGH</i> no caso 2, demonstrando a deleção na região 15q11.2 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	35
Figura 10 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene <i>TUBGCP5</i> determinadas no paciente 2 e nos seus familiares, relativamente aos controlos feminino e masculino.	36
Figura 11 – Resultado do <i>array-CGH</i> no caso 3, demonstrando a deleção na região 15q11.2 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	37
Figura 12 – Resultado do <i>array-CGH</i> no caso 4, demonstrando a duplicação na região 17q12 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	38
Figura 13 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene <i>LHX1</i> determinadas no paciente 4 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.	39

Figura 14 - Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 5, demonstrando a deleção na região 17q12 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	40
Figura 15 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 6, demonstrando a deleção na região 15q26.2qter e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	42
Figura 16 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 7, demonstrando a duplicação na região 8p23.1-pter e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	43
Figura 17 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 7, demonstrando a deleção na região 11q24.2-qter e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	44
Figura 18 - Esquema representativo da translocação entre o cromossoma 8 e o cromossoma 11. Do lado esquerdo apresentam-se os ideogramas dos cromossomas normais e do lado direito os ideogramas dos cromossomas derivativos; no presente caso (caso 7) o resultado obtido pela técnica de <i>array</i> sugere que a paciente é portadora de uma segregação desequilibrada resultante de uma translocação equilibrada entre os cromossomas 8 e 11, ou seja, deverá ter um cariótipo 46, XX,der(11)t(8;11)(p23.1;q24). A presença do derivativo 11 traduz-se em trissomia parcial 8p e deleção parcial do 11q (seta vermelha).	45
Figura 19 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 8, demonstrando a deleção na região 22q11.21 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	46
Figura 20 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 9, demonstrando a duplicação de todo o cromossoma 8.	49
Figura 21 – Cariótipo de linfócitos com padrão de bandas de alta resolução realizado no caso 9, para confirmação da trissomia do cromossoma 8. O resultado do cariótipo (47,XY+8[4]/46,XY[26]) demonstrou ser um caso de trissomia em mosaico. A imagem apresentada corresponde aos cromossomas de uma célula onde está presente a trissomia do cromossoma 8.	49
Figura 22 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 10, demonstrando a deleção na região 1q21.1q21.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	51
Figura 23 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 10, demonstrando a deleção na região 16p11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	52
Figura 24 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 10, demonstrando a deleção na região 7q11.22 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	53
Figura 25 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene AUTS2 determinadas no paciente 10, relativamente aos controlos feminino e masculino.	54
Figura 26 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 11, demonstrando a deleção na região 16p11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	55
Figura 27 - Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene ALDOA determinadas no paciente 11 e nas suas irmãs, relativamente aos controlos feminino e masculino.	55
Figura 28 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 12, demonstrando a deleção na região 16p11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	57
Figura 29 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene ALDOA determinadas no paciente 12 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.	58

Figura 30 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 13, demonstrando a duplicação na região 17p11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	59
Figura 31 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 14, demonstrando a deleção na região 7q11.23 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	61
Figura 32 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 15, demonstrando a duplicação na região 7q11.23 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	63
Figura 33 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 16, demonstrando a deleção na região 1q43 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	66
Figura 34 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene CHRM3 determinadas no paciente 16, relativamente aos controlos feminino e masculino.	67
Figura 35 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 17, demonstrando a deleção na região 1q43 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	68
Figura 36 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene RYR2 determinadas no paciente 17 e na sua mãe, relativamente aos controlos feminino e masculino.	69
Figura 37 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 18, demonstrando a deleção na região 2q33.3 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	70
Figura 38 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene FASTKD2 determinadas no paciente 18, relativamente aos controlos feminino e masculino.	71
Figura 39 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 19, demonstrando a duplicação na região 2q33.1 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	72
Figura 40 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene SATB2 determinadas no paciente 19 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.	73
Figura 41 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 20, demonstrando a duplicação na região 9q33.1 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	74
Figura 42 – Gráficos representativos do resultado do qPCR obtidos através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene ASTN2 determinadas no paciente 20 e nos seus familiares, relativamente aos controlos feminino e masculino.	75
Figura 43 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 21, demonstrando a duplicação na região 16p13.11 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	76
Figura 44 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene NDE1 determinadas no paciente 21 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.	77
Figura 45 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 22, demonstrando a deleção na região 16p13.3 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	78
Figura 46 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do <i>software</i> CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene RBFOX1 determinadas no paciente 22 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.	79

Figura 47 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 23, demonstrando a deleção na região 8p21.3 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.	80
Figura 48 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 24, demonstrando a deleção na região 22q13.33 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região. É apresentada apenas uma imagem correspondendo a uma das irmãs, visto que o resultado foi idêntico nos dois casos.	82
Figura 49 – Resultado do <i>array</i> -CGH no caso 26: a) duplicação na região 8p11.23p11.21: b) duplicação encontrada na região 10p11.21p11.1; c) duplicação encontrada na região 7q11.21.	84

Lista de Abreviaturas

AMPK – *AMP-activated Protein Kinase*

array-CGH – Hibridação Genómica Comparativa em *array*

ATP – Adenosina Trifosfato

BACs – Cromossomas Artificiais Bacterianos

BAF – *Brahma Associated Factor*

bp – Pares de Bases

CGH – Hibridação Genómica Comparativa

CIV – Comunicação Interventricular

CNPs – *Copy Number Polymorphisms*

CNV – Variação no Número de Cópias

DECIPHER – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*

DGV – *Database of Genomic Variants*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Deoxinucleotídeos Trifosfato

FISH – Hibridação *in situ* de Fluorescência

FoSTeS – *Fork Stalling and Template Switching*

kb – Kilobases

LCRs – *Region-specific Low-Copy Repeats*

Mb – Megabases

M-FISH – *Multicolor FISH*

MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NAHR – *Non Allelic Homologous Recombination*

NGS – Sequenciação de Nova Geração

NHEJ – *Non-Homologous End-Joining*

nm – Nanómetro

NOR – Região Organizadora do Nucléolo

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

PAR1 – Região Pseudoautossómica 1

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

QI – Quociente de Inteligência

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

rpm – Rotações por minuto

SKY-FISH – *Spectral Karyotyping FISH*

SNPs – Polimorfismos de um único nucleótido

SPANX – *Sperm Protein Associated with the Nucleus in the X chromosome*

SWI/SNF – *Switch/Sucrose Nonfermentable*

Resumo

O desenvolvimento da técnica de Hibridação Genómica Comparativa em *array* (*array*-CGH) foi um dos grandes avanços no diagnóstico genético. Esta técnica veio permitir analisar todo o genoma com muito maior resolução que os métodos anteriormente utilizados, detetando perdas ou ganhos submicroscópicos de material cromossómico. Estas alterações designam-se por variações do número de cópias (CNVs) e são frequentemente encontradas em casos de atraso mental idiopático, malformações congénitas ou alterações comportamentais, como o autismo. O atraso mental afeta 1% a 3% da população em geral e é definido por um Quociente de Inteligência inferior a 70, acompanhado por limitações no desenvolvimento motor, cognitivo, da linguagem e das capacidades sociais, podendo ocorrer isoladamente ou em combinação com outras malformações. Estima-se que CNVs patogénicas estejam presentes em 5% a 15% dos casos. A descoberta de CNVs patogénicas em indivíduos com atraso mental permite ainda a identificação dos genes responsáveis por esta patologia, aumentando assim a importância dos estudos nesta área da genética humana. O objetivo principal deste trabalho é o estudo de alterações genéticas, nomeadamente CNVs, detetadas em pacientes com diagnóstico de atraso mental.

Foram selecionados 121 pacientes com indicação de atraso mental e/ou cognitivo, acompanhado ou não de outras manifestações clínicas. Foi realizada a técnica de *array*-CGH para a deteção de CNVs patogénicas ou provavelmente patogénicas e os resultados foram, sempre que possível, validados por qPCR. Esta técnica foi também utilizada para o estudo dos familiares, em alguns destes casos.

Através do estudo por *array*-CGH, foram detetadas CNVs patogénicas em 15 indivíduos e provavelmente patogénicas em 11. A taxa de deteção da técnica de *array*-CGH neste conjunto de indivíduos foi de aproximadamente 21.5%. Apesar de existirem algumas limitações, como as dificuldades na interpretação da patogenicidade destas alterações, a técnica de *array*-CGH é o teste de primeira linha a realizar em casos de atraso mental síndrómico ou não síndrómico. O desenvolvimento das técnicas de diagnóstico destas patologias e o estudo das alterações encontradas mostram-se bastante importantes no sentido de facilitar a interpretação dos resultados e melhorar o aconselhamento genético aos pacientes e às suas famílias.

Palavras-chave: *array*-CGH, atraso mental, défice cognitivo, CNV, citogenética, diagnóstico genético.

Abstract

The development of the array-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) was one of the main improvements in genetic diagnosis. Array-CGH allows the screening of an entire genome with a much higher resolution than the techniques previously used, detecting submicroscopic gains and losses of chromosomal material. These alterations are called copy number variations (CNVs) and are frequently found in idiopathic intellectual disability, congenital malformations or behavioral alterations, as autism. Intellectual disability affects 1% to 3% of the general population and is defined by an Intelligence Quotient lower than 70, accompanied by limitations in motor and cognitive development, speech and social skills, and can occur alone or combined with other malformations. It is estimated that pathogenic CNVs are present in 5% to 15% of cases. The detection of pathogenic CNVs in patients suffering from intellectual disability also allows the identification of the genes associated with the disease, increasing the importance of the studies in this field of human genetics. The main goal of this work is to study genetic alterations, particularly CNVs, found in patients diagnosed with intellectual disability.

We selected 121 patients with indication of intellectual disability and/or cognitive impairment, with or without other clinical manifestations. Array-CGH was used to detect pathogenic or probably pathogenic CNVs and the results were, whenever possible, validated by qPCR. This technique was also used for the study of parents or other relatives, in some of the cases.

Through the study by array-CGH, we detected pathogenic CNVs in 15 patients and probably pathogenic CNVs in 11 of them. In this set of patients the detection rate was about 21.5%. Despite some limitations, namely the difficulties in the interpretation of the pathogenicity of CNVs, array-CGH is the first-tier genetic test in patients suffering from intellectual disability in both forms syndromic or nonsyndromic. The development of diagnosis techniques for these conditions and the study of these alterations are very important in order to facilitate the interpretation of the results and to improve the genetic counseling to these patients and their families.

Keywords: array-CGH, intellectual disability, cognitive impairment, CNV, cytogenetics, genetic diagnosis.

Capítulo I Introdução

Introdução geral

A genética é uma área que tem demonstrado grandes progressos, permitindo cada vez mais a compreensão do seu papel na doença humana. Os recentes avanços têm tido um grande impacto no desenvolvimento de novas técnicas de investigação e diagnóstico das doenças genéticas. Será de referir, o culminar do Projeto do Genoma Humano com a publicação da sequência completa do genoma humano, que possibilitou, entre outras coisas, desvendar o número de genes, a sua organização no genoma e identificar mutações e polimorfismos²⁻⁵. Hoje em dia, continuam a existir numerosas investigações, tendo em vista o estudo dos fatores hereditários das doenças mono e poligénicas, com o objetivo de melhorar as técnicas de diagnóstico genético e encontrar novos meios de tratamento e prevenção destas doenças².

Geralmente, as doenças resultam da ação conjunta dos genes e do meio ambiente, no entanto, há determinadas condições patogénicas que se devem exclusivamente ou, em grande parte, a fatores genéticos. Sabe-se que 2% a 3% dos recém-nascidos possui uma anomalia congénita, sendo que 50% são causadas por fatores genéticos e que as anomalias cromossómicas são uma das principais causas de atraso mental e do desenvolvimento. É ainda estimado que, nos países desenvolvidos, mais de 50% da população adulta terá uma doença de origem genética, como cancro ou doenças cardiovasculares^{2; 3}. A genética médica é a área que abrange o estudo e diagnóstico destas doenças, fornecendo o aconselhamento genético apropriado a cada caso³.

Nos últimos anos, com a grande evolução que se tem observado nas tecnologias utilizadas para o diagnóstico de patologias de origem genética, têm sido descritas várias síndromes relacionadas com anomalias cromossómicas. Um dos grandes avanços no diagnóstico genético foi o desenvolvimento da técnica de Hibridação Genómica Comparativa em *array* (*array-CGH*).

A citogenética clássica

A citogenética é o estudo da estrutura, função e evolução dos cromossomas. A citogenética humana deu os seus primeiros passos em 1882 quando Flemming publicou as primeiras imagens de cromossomas humanos⁶ e tem sido marcada com a introdução de novas tecnologias ao longo do tempo^{4; 7}. Em 1952, a utilização acidental de um soluto hipotónico numa cultura celular antes da etapa de fixação, demonstrou que a lise celular permite uma melhor visualização dos cromossomas⁸ e assim, em 1956, Tijo e Levan estabeleceram que o número de cromossomas das células humanas era de 46⁹. Mais tarde, em 1959, foi descrita a primeira alteração cromossómica numérica, com a descoberta de um cromossoma extra em metáfases obtidas de cultura de fibroblastos de pacientes com Síndrome de Down (trissomia 21)¹⁰, seguindo-se também a identificação de novas síndromes como a Síndrome de Turner (45, X)¹¹, a Síndrome de Klinefelter (47,XXY)¹², a Síndrome de Patau (trissomia 13)¹³ e a Síndrome de Edwards (trissomia 18)¹⁴.

O início das técnicas de bandeamento dos cromossomas foi possível com a descoberta da quinacrina, um corante fluorescente que se intercala na cadeia de DNA conferindo a cada cromossoma um padrão de bandas específico surgindo e originando as bandas Q^{15; 16}. No entanto, a intensidade fluorescente da quinacrina demonstrava pouca durabilidade, o que tornava esta técnica pouco adequada aos estudos de rotina de pacientes com anomalias cromossómicas⁴. Por isso, este método foi sendo substituído pelas bandas G^{17; 18}, que combina a ação de uma enzima proteolítica, a tripsina, e do corante Giemsa, tornando-se, na época, o método mais utilizado para o estudo de cromossomas. Com o bandeamento G foi possível identificar cada cromossoma e anomalias cromossómicas anteriormente invisíveis⁷. Na técnica de bandas G produz-se um padrão em que as bandas mais escuras correspondem à heterocromatina (cromatina mais compactada, rica em adenina e timina e com menor conteúdo em genes) e as bandas mais claras correspondem à eucromatina (cromatina menos compactada, rica em genes e em citosina e guanina). Foram também desenvolvidas as técnicas de bandas R (produz um padrão de bandas inverso às bandas Q e G), bandas C (cora a heterocromatina presente nas regiões centroméricas) e bandas NOR (utiliza nitrato de prata que se liga às NOR – região organizadora do nucléolo – dos cromossomas acrocêntricos). As bandas C e NOR são utilizadas como auxiliares às bandas G pois podem permitir identificar, por exemplo, cromossomas dicêntricos e cromossomas marcadores supranumerários, respetivamente⁴.

Todos estes desenvolvimentos nas técnicas de bandeamento dos cromossomas foram possíveis devido aos avanços nas culturas celulares. A descoberta da fitohemaglutinina, uma substância que estimula a divisão dos linfócitos *T in vitro*, permitiu que fosse possível o estudo do cariótipo a partir de uma pequena quantidade de sangue periférico^{4; 5; 19}. No entanto, as bandas G têm uma resolução de apenas 5-10 megabases (Mb) (cerca de 500 bandas por genoma haploide), não permitindo observar alterações de tamanho inferior⁵. A resolução do cariótipo foi aumentada com o desenvolvimento das bandas de alta resolução, a partir de culturas de linfócitos sincronizados (Figura 1)²⁰. Utilizam-se substâncias que sincronizam o ciclo celular: o metotrexato (bloqueia as células em fase S) e a timidina (desbloqueia as células em fase S). Assim, é possível obter um maior número de células em pró-metáfase, momento que os cromossomas se encontram mais alongados, aumentando o número de bandas visíveis (1000 bandas por genoma haploide) e permitindo a caracterização mais precisa de síndromes já conhecidas, assim como, a identificação de alterações mais subtis⁴.

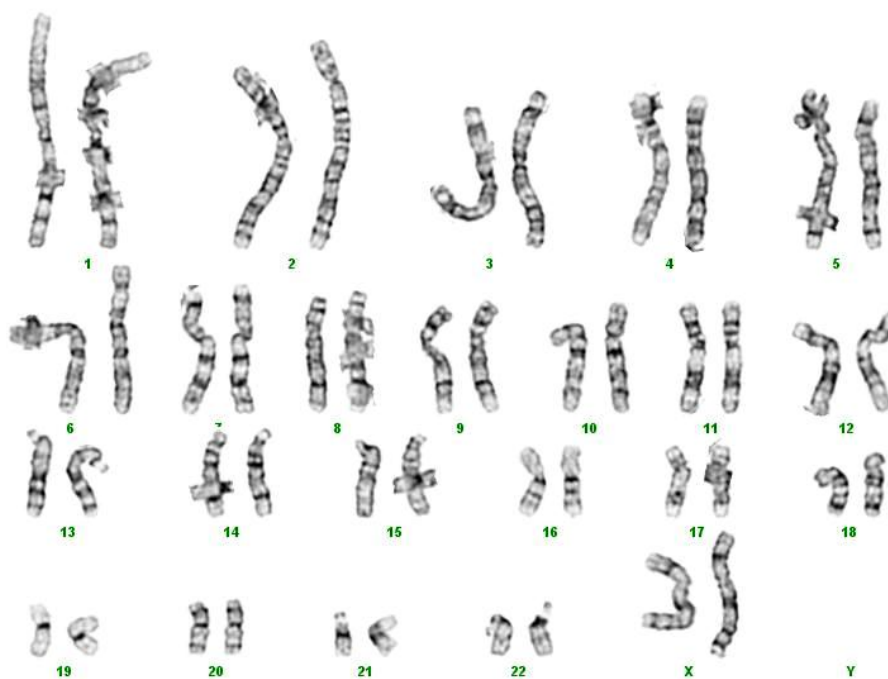


Figura 1 – Exemplo de cariótipo de linfócitos com padrão de bandas de alta resolução de um indivíduo do sexo feminino (46, XX) (Imagem cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto).

A citogenética molecular

Apesar do desenvolvimento das bandas de alta resolução, este método continuava ainda insuficiente para detetar anomalias estruturais em muitos pacientes com sintomas de síndromes cromossómicas. Por isso foi necessário acrescentar novos métodos à citogenética clínica, nascendo assim a citogenética molecular, que combina princípios de biologia molecular com o estudo dos cromossomas⁴.

Um dos métodos mais utilizados na citogenética molecular é a Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH), em que se utiliza uma sonda de DNA que reconhece uma região específica de um cromossoma (Figura 2). Após a cultura e sincronização das células, o DNA alvo, em núcleos em interfase ou em metáfase, é fixado e desnaturado numa lâmina e posteriormente hibridizado com a sonda, que pode ser de marcação direta, quando já contém um fluorocromo ligado a um nucleótido, ou de marcação indireta, quando contém um nucleótido associado a um hapteno com afinidade para o anticorpo ligado a um fluorocromo. O tempo de hibridação depende da sonda utilizada e do seu tamanho. Os sinais da hibridação são observados no microscópio de fluorescência⁵.

Com a sequenciação do genoma humano no âmbito do Projeto do Genoma Humano ficou disponível uma grande quantidade de sondas resultantes de segmentos clonados e mapeados. Existem sondas específicas para diferentes regiões dos cromossomas, como as sondas teloméricas ou subteloméricas, sondas centroméricas (α -satélite), sondas *locus*-específicas ou sondas de pintura cromossómica total (específicas para um cromossoma inteiro) ou parcial (específicas para o braço p ou q de um cromossoma). A técnica de FISH pode ser utilizada para nomeados fins, nomeadamente para pesquisa de aneuploidias em amniócitos (diagnóstico pré-natal), para identificar ou confirmar síndromes de microdeleções e microduplicações, para estudos na área da oncologia e para identificar translocações e cromossomas marcadores⁵.

Foram desenvolvidas também outras técnicas derivadas da FISH, como por exemplo, o FISH-*multiprobe* telomérico para estudo de alterações subteloméricas em casos de atraso mental²¹, o SKY-FISH (*spectral karyotyping* FISH) e o M-FISH (*multicolor* FISH), que consistem na utilização de sondas de pintura cromossómica total que conferem aos cromossomas cores distintas, permitindo identificar cada um deles²².

A partir do princípio da técnica de FISH, foi criada a Hibridação Genómica Comparativa (CGH), que permite, numa só hibridação, a análise de todo o genoma e a

identificação de deleções e duplicações. Inicialmente, a CGH foi utilizada no estudo de alterações cromossómicas em células tumorais²³. O procedimento consiste em utilizar o DNA extraído de uma amostra de referência e uma amostra teste e marcá-lo diferencialmente, com corantes fluorescentes, por exemplo, verde e vermelho. As amostras de DNA marcado são co-hibridadas numa lâmina contendo cromossomas em metáfase derivados de células controlo. Após a hibridação, as lâminas são observadas ao microscópio de fluorescência e as imagens são analisadas recorrendo a um *software* adequado que quantifica o rácio de fluorescência ao longo de cada cromossoma. O aumento da intensidade de fluorescência verde ou vermelha indica perda ou ganho de material cromossómico em relação ao genoma de referência.

A grande vantagem da técnica de CGH em relação à de FISH consiste no facto de não requerer a obtenção de cromossomas em metáfase, evitando assim as dificuldades e tempo consumido nas culturas celulares. No entanto, e apesar de esta técnica ter vindo facilitar a identificação de novas anomalias cromossómicas, não aumentou significativamente a resolução comparativamente à técnica de bandas G, sendo também considerado um procedimento demorado⁵.

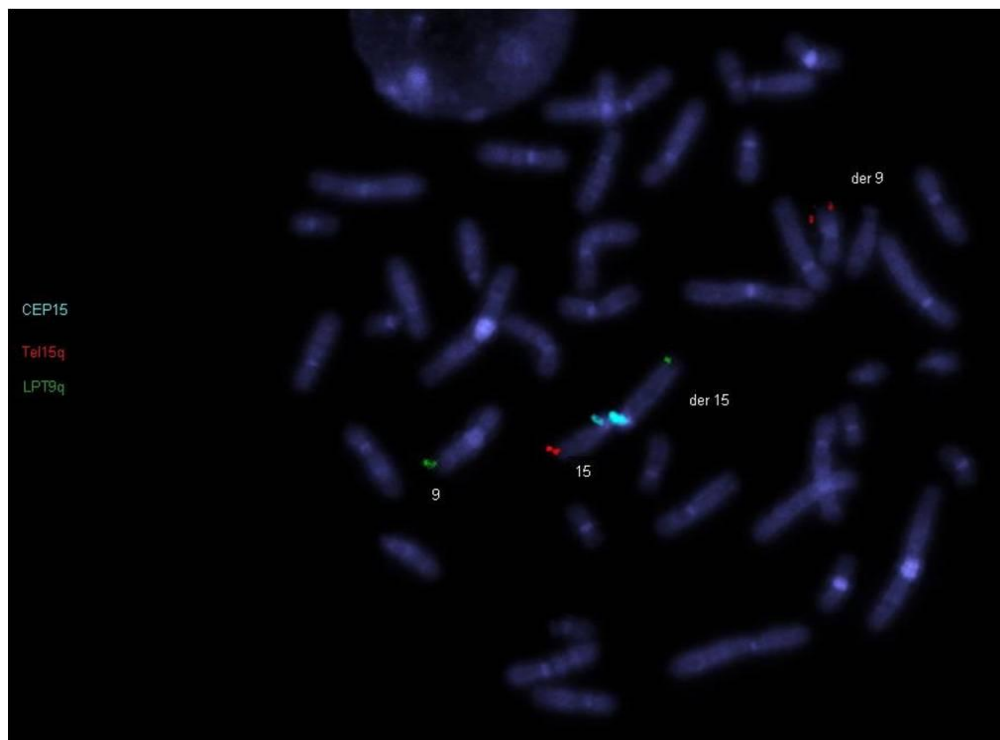


Figura 2 – Exemplo de uma translocação entre o cromossoma 15 e o cromossoma 9, identificada por FISH. Neste caso foram utilizadas três sondas: a CEP15 (azul) que marca o centrómero do cromossoma 15, a Tel15q que marca a região telomérica do cromossoma 15 (vermelho) e a LPT9q que marca a região telomérica do cromossoma 9 (verde). Observa-se que o cromossoma identificado como der15 possui o centrómero do cromossoma 15, mas contém a região telomérica do cromossoma 9, enquanto que o cromossoma der9 possui a região telomérica do cromossoma 15. Alteração identificada como t(9;15) (q22.3;q26.3) (Imagem cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto).

A técnica de *array-CGH*

A técnica de *array-CGH* é uma técnica molecular com aplicações na citogenética e baseia-se no mesmo princípio da CGH^{24; 25}. O seu desenvolvimento veio permitir analisar todo o genoma com muito maior resolução que as técnicas anteriormente descritas²⁶⁻²⁸, detetando perdas ou ganhos submicroscópicos de material cromossómico (microdeleções ou microduplicações). Estas alterações designam-se por variações do número de cópias (CNVs) e são frequentemente encontradas em casos de atraso mental idiopático, malformações congénitas ou alterações comportamentais, como o autismo²⁹⁻³¹. Esta técnica é, por isso, o teste de primeira linha a realizar em pacientes que demonstram estas patologias²⁷.

É utilizado o DNA extraído da amostra do paciente e DNA proveniente de uma amostra controlo normal de origem feminina ou masculina, de acordo com o paciente em estudo. Cada amostra de DNA é marcada com um corante fluorescente verde (cianina 3) ou vermelho (cianina 5), sendo posteriormente co-hibridadas numa lâmina de *array* na presença de Cot-1 (sequência de DNA que evita ligações inespecíficas). O *array* contém sondas representativas do genoma humano, com as quais o DNA teste e o DNA controlo hibridam competitivamente. Após a hibridação, a fluorescência de cada *spot* do *array* é lida por um *scanner* e os resultados são analisados por um *software*. As regiões do genoma com igual número de cópias entre o DNA do paciente e o DNA controlo apresentam uma fluorescência “amarela”, resultado da igual contribuição de cada um dos corantes. Se o paciente possuir uma deleção em relação à amostra controlo, a região deletada apresenta a cor com o qual o DNA controlo foi marcado, enquanto que nos casos das duplicações, a região duplicada apresenta a fluorescência da mesma cor com que foi marcado o DNA do paciente^{26; 29} (Figura 3). O *software* de análise permite analisar a hibridação das sondas ao longo de cada cromossoma (Figura 4).

Inicialmente, as sondas utilizadas nos *arrays* consistiam em cromossomas artificiais bacterianos (BACs), que são grandes fragmentos de DNA com mais de 10 kilobases (kb) e podem cobrir todo o genoma ou incidir em regiões específicas, como por exemplo, em regiões subteloméricas ou em regiões conhecidas como possíveis causadoras de síndromes de microdeleção ou microduplicação^{27; 29}. Atualmente, e devido à grande quantidade de informação obtida a partir da sequenciação completa do genoma humano, as sondas mais utilizadas são os oligonucleotídeos, pois oferecem uma maior cobertura de todo o genoma humano, aumentando a resolução do *array*²⁶. As sondas de oligonucleotídeos são mais curtas que os BACs, variando

geralmente entre os 50 e 70 pares de base (bp)²⁹. Existem vários tipos de plataformas de *array* disponíveis comercialmente, apresentando diferentes características em termos de resolução, cobertura do genoma e utilização para diagnóstico. A resolução do *array* depende da distância entre as sondas e se estas estão distribuídas maioritariamente por regiões ricas em genes ou igualmente por todo o genoma. Existem também *arrays* de oligonucleotídeos com maior concentração em *loci* conhecidos por estar envolvidos em certas doenças, como o atraso mental. Foi ainda desenvolvido outro tipo de *array*, que adiciona SNPs, ou seja, polimorfismos de um único nucleótido (SNPs *array*) que, como o nome indica, contém oligonucleotídeos que permitem a deteção de SNPs, tendo também a vantagem de identificar casos de isodissomia uniparental e perda de heterozigotia³².

A técnica de *array*-CGH permite determinar o tamanho e limite das CNVs encontradas, o que é essencial para perceber quais os genes envolvidos na alteração³². No entanto, a utilização deste procedimento terá como desvantagem a impossibilidade de detetar alterações equilibradas, como por exemplo, translocações recíprocas ou inversões²⁸. Para além disso, principalmente nas CNVs de tamanho inferior a 100 kb, recomenda-se que sejam confirmadas por outra técnica. A confirmação dos resultados é feita, na maioria das vezes, recorrendo às técnicas de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) ou por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

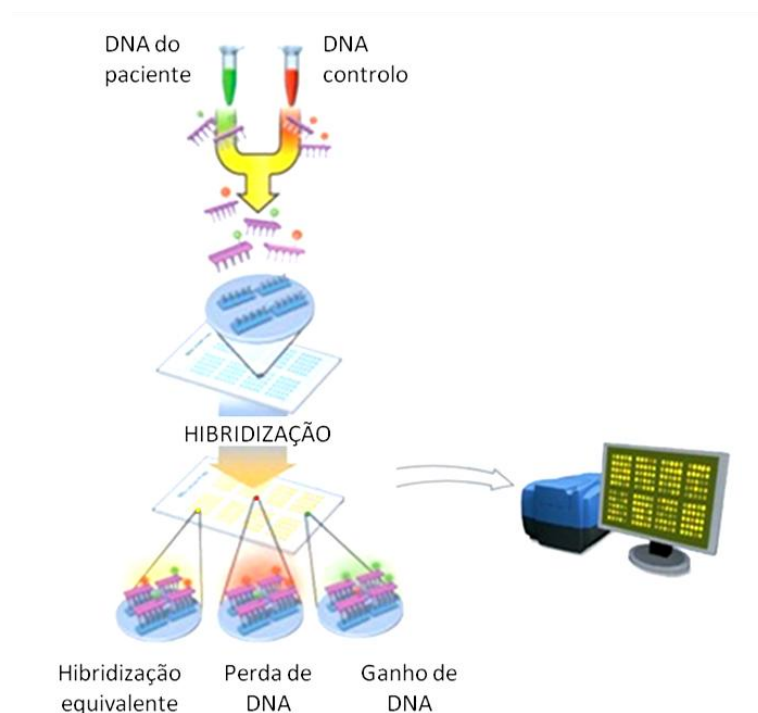
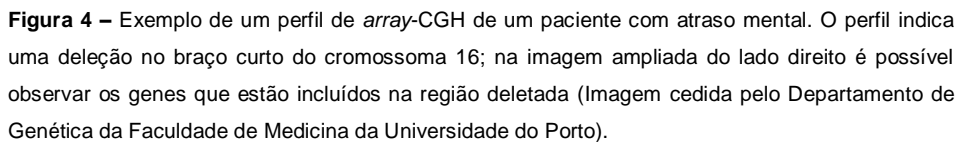


Figura 3 – Esquemática da técnica de *array*-CGH. O DNA do paciente e DNA controlo são marcados com corantes fluorescentes e aplicados no *array*, onde hibridizam competitivamente com as sondas representativas do genoma humano. Os resultados da hibridização são analisados por um *software*, através de um *scanner* que capta a intensidade da fluorescência. As diferenças na hibridização indicam ganho ou perda de DNA (Adaptado de Kharbanda et al. ¹).



O atraso mental é definido pela Organização Mundial da Saúde por um quociente de Inteligência (QI) menor de 70, acompanhado por limitações no desenvolvimento motor, cognitivo, da linguagem e das capacidades sociais, podendo ocorrer isoladamente ou em combinação com outras malformações³³⁻³⁵. O QI dos indivíduos deve ser determinado através de testes padronizados e apropriados ao nível funcional e condições físicas limitativas do indivíduo, como por exemplo, deficiência de linguagem ou audição. No entanto, uma vez que nem sempre é possível realizar o teste de QI, o atraso mental é também identificado nos casos em que há um nível reduzido de atividade funcional e cognitiva que leva a uma limitação às tarefas diárias^{28; 34; 36}.

O atraso mental é classificado de acordo com o QI apresentado: leve ($50 < \text{QI} < 70$), moderado ($35 < \text{QI} < 49$), severo ($20 < \text{QI} < 34$) e profundo ($\text{QI} < 20$)^{33; 34}. Os indivíduos com atraso mental leve têm um atraso na aprendizagem da linguagem e as principais dificuldades são no desempenho escolar, a ler e escrever. No entanto, a maioria atinge independência nos cuidados pessoais e nas atividades domésticas. No atraso mental moderado, os indivíduos têm um desenvolvimento atrasado e limitado da linguagem e da compreensão, apesar de uma parte conseguir aprender o básico

para ler, escrever e contar. Alguns destes indivíduos necessitam ainda de supervisão e acompanhamento nas tarefas do dia-a-dia. Quanto ao atraso mental severo, a maioria dos pacientes demonstram grandes limitações motoras, que indicam danos ou malformações no sistema nervoso central. Os indivíduos que sofrem de atraso mental profundo são severamente limitados na compreensão e comunicação verbal e muitos deles são imóveis ou com mobilidade muito restrita e incontinentes, sendo incapazes de cuidar das suas necessidades básicas e, por isso, necessitando de ajuda e supervisão constante³⁴.

Para além do nível de QI, o atraso mental pode também ser dividido em síndrómico e não-sindrómico. No atraso mental síndrómico, os indivíduos apresentam também outros sintomas clínicos ou malformações. O não-sindrómico tem sido definido como os casos em que o atraso mental é a única manifestação clínica. No entanto, a classificação destes dois tipos de atraso mental pode apresentar dificuldades, pois podem existir outros distúrbios neurológicos ou psiquiátricos muito subtis e difíceis de identificar, devido ao subdesenvolvimento cognitivo destes indivíduos³⁷.

A prevalência do atraso mental está estimada em 1% a 3% da população em geral, observando-se frequências mais elevadas entre crianças e adolescentes e nos países em desenvolvimento^{28; 35; 38}. A alta prevalência nos países em desenvolvimento pode ser explicada pela falta de exames e supervisão pré-natal, atraso no crescimento intrauterino, infeções e lesões durante a gravidez e parto devido às condições de saúde precárias e também pela frequente ocorrência de consanguinidade^{38; 39}. É também evidente que o atraso mental é mais incidente entre os indivíduos do sexo masculino, principalmente nos casos menos severos. À medida que a severidade da patologia aumenta, a diferença entre pacientes femininos e masculinos diminui³⁷.

O atraso mental constitui uma das principais indicações para a avaliação genética, particularmente nas crianças^{33; 36; 40; 41}. Para além disso, a prevalência de outros distúrbios mentais é três a quatro vezes mais elevada em indivíduos que sofrem de atraso mental do que na população em geral³⁴.

As causas do atraso mental

O atraso mental é o resultado de disfunções no sistema nervoso central, que apresentam consequências muito variáveis. Por isso, qualquer dano que possa interferir com o crescimento e desenvolvimento normal do cérebro pode levar ao atraso mental²⁸. As causas são muito heterogêneas, o que aumenta a dificuldade do

diagnóstico e apesar de todas as técnicas disponíveis, em cerca de 50% dos casos de atraso mental, não se consegue ainda encontrar a causa da patologia. Podem estar na origem do atraso mental vários fatores pré-natais, peri-natais e pós-natais, de origem genética ou ambiental^{33; 35; 40}. De entre os pré-natais, destacam-se as causas genéticas, podendo ser mutações num único gene ou anomalias cromossómicas numéricas ou estruturais (microscópicas ou submicroscópicas)^{28; 33; 35}. Pensa-se que as causas genéticas estejam presentes em 25-50% dos casos, sendo que a prevalência de anomalias genéticas aumenta com o aumento da severidade com que o atraso mental se manifesta^{37; 42}.

Grande parte dos genes já identificados relacionados com o atraso mental encontra-se no cromossoma X, devido à facilidade de estudar as famílias com doenças hereditárias ligadas a este cromossoma^{35; 40}. É estimado que 8-12% dos casos de atraso mental em indivíduos do sexo masculino sejam devidos a alterações no cromossoma X³⁹. No entanto, alterações e mutações nos autossomas têm um papel predominante na origem do atraso mental, sendo que a maioria dos genes afetados por estas alterações estão ainda por identificar^{35; 41}.

Cerca de 15% dos pacientes com atraso mental apresenta uma anomalia cromossómica microscópica, detetável por técnicas de citogenética clássica, sendo que a mais frequente é a trissomia 21^{39; 42}. Estas alterações cromossómicas, que podem ser numéricas ou estruturais (deleções, duplicações, translocações, inversões), têm sido também reconhecidas como uma importante causa para o atraso mental e malformações, pois estão associadas com grandes desequilíbrios genéticos, envolvendo vários genes e alterando a sua dosagem^{35; 43}.

O desenvolvimento das técnicas de citogenética molecular permitiu a identificação de alterações submicroscópicas, anteriormente não detetáveis através da citogenética clássica. As alterações submicroscópicas subteloméricas têm sido identificadas como causas do atraso mental, principalmente das formas não-sindrómicas. Estas alterações podem incluir deleções, translocações ou outras alterações cromossómicas. As regiões subteloméricas são muito ricas em genes, sendo que estas alterações podem ser responsáveis por 3-6% dos casos³⁷. Mais recentemente, a introdução da técnica de *array*-CGH e a sua utilização em estudos com grandes grupos de pacientes com atraso mental, levou à identificação de várias CNVs patogénicas associadas a esta patologia.

As CNVs – variantes comuns da população e variantes patogénicas

As variações no genoma humano podem assumir várias formas, desde alterações cromossómicas visíveis microscopicamente até alterações num único nucleótido. As CNVs fazem parte destas variações que contribuem para a variabilidade genética humana e o seu tamanho pode variar entre kilobases e megabases⁴⁴. São definidas como segmentos de DNA de tamanho igual ou superior a 1kb que apresentam um número de cópias variável em relação a um genoma de referência, incluindo deleções, duplicações ou inserções. As CNVs que ocorrem em mais de 1% da população são também designadas por *copy number polymorphisms* (CNPs) e aquelas com tamanho igual ou superior a 50kb são conhecidas como CNVs de larga escala⁴⁵.

As CNVs podem constituir 12% do genoma, na população normal, no entanto a recente introdução da técnica de *array*-CGH na rotina do diagnóstico, revelou que estas alterações, em formas mais raras, estão também associadas a várias doenças do foro neurológico, como o atraso mental, esquizofrenia ou autismo^{26; 37}. Estima-se que CNVs patogénicas estejam presentes em 5-15% dos casos de atraso mental³¹, aumentando a sua frequência para 20-25% em crianças com atraso mental moderado a severo acompanhado de malformações ou dismorfismos²⁹. As CNVs patogénicas associadas ao atraso mental levam a distúrbios nas vias neurológicas e, por isso, causam fenótipos com função cognitiva anormal²⁶. Sabe-se que os genes presentes nestas microdeleções ou microduplicações são maioritariamente expressos no cérebro e codificam proteínas envolvidas em vários processos celulares, como fatores de transcrição, proteínas transmembranares, proteínas associadas aos microtúbulos e actina ou proteínas envolvidas em funções sinápticas, demonstrando assim grande importância no desenvolvimento do sistema nervoso^{40; 46; 47}.

Têm sido descritos vários mecanismos que levam à formação de CNVs durante a divisão celular, como a *Non Allelic Homologous Recombination* (NAHR), quando existe recombinação entre regiões flanqueantes repetitivas, o *Non-Homologous End-Joining* (NHEJ), quando ocorre a religação das cadeias duplas de DNA que sofreram uma quebra, e o *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS), que ocorre durante a replicação do DNA, quando o “garfo” de replicação encontra uma região difícil de replicar, estagnando e trocando para a cadeia de DNA complementar para continuar a replicação e ultrapassar algum erro ou quebra do DNA^{48; 49}.

O estudo genético do atraso mental por *array*-CGH – a identificação de CNVs e a sua interpretação

A introdução do *array*-CGH como o teste de primeira linha em casos de atraso mental veio aumentar significativamente a capacidade de diagnóstico deste grupo de pacientes, sendo utilizada com o objetivo de identificar anomalias cromossómicas ou CNVs diretamente responsáveis pelo fenótipo do paciente²⁶. Vários estudos reportam a eficácia desta técnica no estudo genético do atraso mental, cujos resultados demonstram que permite reportar alterações cromossómicas submicroscópicas em 5-20% casos, dependendo dos estudos, dos pacientes estudados e das plataformas de *array* utilizadas²⁸.

O aumento significativo da capacidade de diagnóstico permitiu aumentar a qualidade do aconselhamento genético fornecido aos pacientes e às suas famílias. O aconselhamento genético é muito importante, não só para a compreensão da causa do distúrbio do paciente, como também para estimar o risco de ocorrência numa futura gravidez²⁶.

No entanto, este aumento da capacidade de diagnóstico também aumentou a dificuldade na interpretação dos resultados, pois são identificadas muitas variantes comuns da população³² e torna-se difícil distinguir entre estas variantes e aquelas que são a causa do fenótipo. Geralmente, há características das CNVs que podem ajudar na sua interpretação. Quanto maior for a alteração encontrada e maior o seu conteúdo em genes, mais probabilidade existe de ser patológica. É também mais provável que as CNVs que ocorrem *de novo* no paciente afetado estejam associadas com a patologia do que aquelas que foram herdadas de um dos progenitores. Para além disto, as deleções são também mais frequentemente associadas ao fenótipo do que as duplicações. No entanto, a análise dos resultados não pode ser feita seguindo estes critérios de forma linear. É necessário ter em conta os genes afetados pela alteração, pois mesmo uma CNV de tamanho reduzido pode ser considerada patológica se afetar um ou mais genes sensíveis à dosagem. Existem também alterações que apresentam uma penetrância incompleta, levando a uma variação da expressão do fenótipo. Assim, uma CNV herdada de um progenitor pode também ser considerada patológica, mesmo que este não demonstre qualquer sintoma da patologia, ou apresente sintomas mais leves que o da criança^{28; 29}. Por isso, é importante o estudo genético dos progenitores, para a interpretação de uma alteração provavelmente patológica encontrada na criança. Para este estudo normalmente recorre-se à mesma técnica utilizada para a validação dos resultados do *array*-CGH.

Estão disponíveis alguns recursos *online*, como bases de dados, que apoiam a interpretação das alterações encontradas. Alguns exemplos são a *Database of Genomic Variants* (DGV) que é uma base de dados das variantes encontradas em indivíduos saudáveis⁵⁰, a *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER) que lista as alterações submicroscópicas potencialmente patogénicas e faz a associação com o fenótipo provocado⁵¹ e o *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) que reúne genes e patologias genéticas humanas⁵².

Nos últimos anos têm surgido diversos estudos que reportam as CNVs encontradas por *array*-CGH em grupos de pacientes com atraso mental e outras anomalias congénitas, que têm ajudado a delinear novas síndromes relacionadas com alterações cromossómicas submicroscópicas^{26; 29}. A identificação das síndromes de microdeleção/microduplicação é baseada na relação genótipo/fenótipo que associa alterações cromossómicas semelhantes aos sintomas clínicos coincidentes apresentados pelos pacientes afetados²⁸. É importante esclarecer as consequências funcionais de cada CNV e o seu impacto no fenótipo para que se consiga identificar facilmente as alterações patogénicas, facilitando o diagnóstico e aconselhamento genético destes pacientes³¹. A descoberta de CNVs patogénicas em indivíduos com atraso mental permite ainda a identificação dos genes responsáveis por esta patologia, aumentando assim a importância dos estudos nesta área da genética humana³⁷.

Capítulo II Objetivos

Este trabalho está inserido no estágio no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, no qual se pretende a aprendizagem e aquisição de competências nas técnicas utilizadas em diagnóstico genético.

Mais especificamente, na elaboração deste projeto, o objetivo principal é o estudo de alterações genéticas, nomeadamente CNVs, detetadas em pacientes com diagnóstico de atraso mental que realizaram estudo genético no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Para tal, foram definidos os seguintes objetivos:

- Determinar a presença de CNVs por *array-CGH* e defini-las como patogénicas, de significado desconhecido (provavelmente patogénicas ou provavelmente benignas) ou benignas.
- Nos casos em que sejam detetadas CNVs patogénicas ou provavelmente patogénicas, validar os resultados por qPCR.
- Sempre que possível, realizar o estudo genético dos progenitores e/ou outros familiares por qPCR, de forma a identificar as alterações *de novo* e hereditárias.
- Interpretar a patogenicidade das CNVs, identificar os genes presentes nas CNVs patogénicas ou provavelmente patogénicas e estabelecer a sua relação com o fenótipo apresentado pelo paciente.
- Elaborar uma base de dados com as CNVs encontradas, os genes presentes e o fenótipo causado.

Capítulo III Metodologia

Obtenção e preparação das amostras biológicas

O estudo genético dos pacientes que frequentam a Consulta de Genética ou de Neurodesenvolvimento do Hospital de São João, EPE Porto, é realizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. As informações clínicas dos pacientes são fornecidas pelo médico assistente (geneticista e/ou pediatra). As amostras são obtidas através da colheita de sangue periférico dos pacientes.

Para este trabalho, foram selecionados 121 pacientes com indicação de atraso mental e/ou cognitivo, acompanhado ou não de outros sintomas. Através da análise por *array*-CGH foram detetadas CNVs patogénicas ou provavelmente patogénicas em 26 destes pacientes, cujos resultados foram, sempre que possível, validados por qPCR. Esta técnica foi também utilizada para o estudo dos familiares, em alguns destes casos. O procedimento de recolha das amostras dos familiares é igualmente por colheita de sangue periférico.

Extração de DNA a partir de sangue periférico

A extração de DNA a partir de sangue periférico dos pacientes e familiares foi inicialmente realizada recorrendo ao *kit* de extração de DNA da Citogene (Citomed, Lisboa, Portugal), cujo protocolo se encontra em anexo (Anexo 1). Resumidamente, neste procedimento utilizam-se 2 mL de sangue total centrifugado (*buffy coat* e plasma) que, entre centrifugações, é exposto inicialmente a um tampão de lise dos glóbulos vermelhos, seguido de um tampão de lise celular para lise dos glóbulos brancos e de um tampão de precipitação de proteínas. Seguidamente, o sobrenadante resultante é incubado com isopropanol para precipitação do DNA até obtenção da “medusa” de DNA. O DNA é posteriormente adicionado a um tubo com etanol 70% e centrifugado. O *pellet* de DNA é ressuspendido numa solução de hidratação do DNA, incubado durante a noite à temperatura ambiente e, por fim, armazenado a 4°C.

O método de extração de DNA foi posteriormente alterado, passando a ser utilizado um protocolo automático da Prepito (Chemagen AG, Baesweiler, Alemanha).

Este método utiliza um aparelho (*Chemagic Prepito*) no qual se inserem os reagentes necessários e o sangue total e baseia-se na utilização de esferas magnéticas (*beads*) para extração do DNA. O respetivo protocolo encontra-se em anexo (Anexo 2).

Array-CGH e deteção de CNVs

A técnica de *array*-CGH foi utilizada com o objetivo de detetar CNVs patogénicos responsáveis pelo atraso mental e outros sintomas clínicos manifestados pelos pacientes. Para tal, foram utilizados os *arrays Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), que consistem em plataformas de 4x180K, ou seja, com 180000 sondas *in situ* de oligonucleótidos para quatro conjuntos de amostras (amostra teste e amostra de referência). O protocolo mais detalhado deste procedimento encontra-se em anexo (Anexo 3).

Quantificação do DNA

O primeiro passo a realizar é a quantificação do DNA, para que se certifique que este se encontra em boa qualidade e quantidade. A quantificação é feita no NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), é medida a absorvância a 230 nanómetros (nm), 260nm e 280nm e os valores são comparados aos valores de referência para DNA puro e de alta qualidade (Tabela 3. A do Anexo 3). Os valores pretendidos são um quociente entre as absorvâncias a 260nm e a 280nm entre 1.8 e 2.0 e um quociente entre as absorvâncias a 260nm e a 230nm superior a 1.0.

Preparação das amostras

Assim que a pureza e qualidade do DNA estejam asseguradas, passa-se à preparação das amostras. Para cada plataforma de *array*, são preparadas quatro amostras teste (provenientes dos pacientes) e quatro amostras de referência, que funcionam como controlo de origem masculina ou feminina. A utilização de um controlo de acordo com o género do paciente em estudo é importante para a análise dos cromossomas sexuais. Para cada amostra é utilizado cerca de 1µg de DNA em 26µL.

Marcação do DNA

Após a preparação das amostras, procede-se à marcação fluorescente do DNA. É preparada uma *Master Mix* de marcação (Tabela 3. B do Anexo 3) que contém

o *Reaction Buffer*, deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), o *Exo (-) Klenow*, que consiste num fragmento proteico que funciona como polimerase, e ainda a cianina 3 (verde), para marcar a amostra teste, ou a cianina 5 (vermelho), para marcar a amostra de referência. As amostras são inicialmente incubadas com um *Random Primer* durante 10 minutos a 98°C, transferidas para gelo e centrifugadas. Em seguida, é adicionada a *Master Mix* de marcação respetiva e, utilizando um termociclador, as amostras são sujeitas a 37°C durante 2 horas, 65°C durante 10 minutos e, por fim, mantidas a 4°C.

Purificação do DNA marcado

Depois da marcação das amostras, é necessário purificar o DNA marcado para eliminar reagentes e fluoróforos não incorporados, através de colunas de purificação. As amostras são centrifugadas e transferidas juntamente com tampão TE (ph 8) para uma coluna, que por sua vez está colocada num *ependorf*. As amostras são centrifugadas, o eluído é descartado e é novamente adicionado o tampão TE, centrifugando-se novamente de seguida. As colunas são invertidas para um novo *ependorf* e centrifugadas novamente, para recolher a amostra purificada.

Após a purificação, o DNA marcado é novamente quantificado no NanoDrop e são calculados os valores de rendimento (*Yield*) e da atividade específica das cianinas e comparados com os valores esperados (Tabela 3. C do Anexo 3). Os valores esperados para o rendimento são entre 9µg e 12µg, para a atividade específica da cianina 3 são entre 25pmol/µg e 40 pmol/µg e para a atividade específica da cianina 5 são entre 20pmol/µg e 35pmol/µg.

Hibridação

Para a hibridação é necessário preparar a *Master Mix* de hibridação (Tabela 3. D do Anexo 3). Esta é constituída por *HI-RPM Hybridization Buffer*, *Cot-1 DNA* e *aCGH Blocking Agent*. Estes dois últimos reagentes têm a finalidade de eliminar e evitar ligações inespecíficas entre os fragmentos de DNA. A *Master Mix* de hibridação é adicionada a cada par de amostras já marcadas (amostra teste e amostra de referência), sendo, posteriormente, incubadas a 98°C durante 3 minutos e transferidas imediatamente para 37°C, permanecendo a esta temperatura durante 30 minutos. As amostras são, por fim, centrifugadas.

Em seguida, é preparada a câmara de hibridação. Na base da câmara é colocado o *gasket slide*, sobre o qual são colocados 100µL de cada amostra no respetivo poço. O *array* é colocado com a face que contém as sondas voltada para baixo, sobre o *gasket slide* e a câmara é fechada com a proteção, apertando o parafuso. Depois de bem fechada, deve-se rodar a câmara lentamente, verificando

que a bolha de ar se desloca e que a amostra flui livremente pelo poço (Figura 3. A do Anexo 3). A câmara é então colocada no forno de hibridação, onde permanece por 24 horas a 67°C a 20 rotações por minuto (rpm).

Lavagens

Após a hibridação é necessário proceder às lavagens do *array*. São preparadas três soluções de lavagem. A primeira contém o *Oligo aCGH Wash Buffer 1*, a segunda contém o mesmo tampão mas é colocado num agitador com um magneto e a terceira é constituída pelo *Oligo aCGH Wash Buffer 2* e é colocada num agitador com um magneto e à temperatura de 37°C. A *sandwich array/gasket slide* é incubada na primeira solução de lavagem e, com uma pinça, o *array* é separado do *gasket slide*. Em seguida, o *array* é transferido para a segunda solução, onde permanece durante 5 minutos, sendo depois incubado durante 1 minuto na terceira solução. Depois das lavagens, o *array* é colocado no *slide holder* (Figura 3. B do Anexo 3) que é depois inserido no *scanner* para leitura da fluorescência de cada *spot* do *array* após a hibridação das amostras de DNA marcado.

Análise dos resultados

Depois da leitura da fluorescência pelo *scanner*, os dados obtidos são exportados para o *software* de análise, o CytoGenomics v2.7.22.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Este *software* avalia a hibridação do DNA teste e do DNA de referência com as sondas presentes no *array*, posicionando-as ao longo de cada cromossoma. É reportado um desequilíbrio quando pelo menos 3 sondas consecutivas indicam deleção ou duplicação. Para comparação e localização das posições genómicas foi usado o *Human Genome Build 19* (hg19), GRCh37.

As CNVs encontradas foram interpretadas com recurso a ferramentas bioinformáticas. Foi utilizada a DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) para verificar se as CNVs já tinham sido reportadas em indivíduos saudáveis, o DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) para confirmar se as CNVs estão reportadas como patogénicas e se têm já um fenótipo associado e o OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), no sentido de apurar se algum gene presente na CNV em questão está associado a alguma patologia humana. A PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) pode também ser utilizada para pesquisar se as CNVs já foram reportadas em alguns indivíduos ou se algum dos genes abrangidos pela CNV tem expressão relacionada com o fenótipo do paciente. O Ensembl (<http://grch37.ensembl.org/index.html>) foi utilizado para localizar as coordenadas genómicas de cada alteração, para verificar que região dos genes afetam. Foi ainda

utilizada uma base de dados de CNVs já analisadas no laboratório, no sentido de apurar se a CNV em questão já tinha sido classificada. Após a interpretação, é utilizada uma classificação interna do laboratório para definir cada CNV e ajudar na decisão de quais CNVs terão de ser validadas e em que casos será necessário o estudo genético dos progenitores. Assim, as CNVs são definidas de acordo com a seguinte classificação:

I – Deleções ou duplicações em região associada a síndrome de microdeleção ou microduplicação (CNVs patogénicas).

II – Deleções ou duplicações que não estão descritas na DGV até à presente data e envolvem genes codificantes conhecidos (CNVs provavelmente patogénicas ou que exigem investigação dos progenitores).

IIIA – Deleções ou duplicações que, até à presente data, estão descritas com baixa frequência na DGV ou não são sobreponíveis com as descritas na DGV, envolvendo genes codificantes conhecidos.

IIIB – Deleções ou duplicações que, até à presente data, estão descritas com baixa frequência na DGV ou não são sobreponíveis com as descritas na DGV, não envolvendo genes codificantes conhecidos.

IV – Deleções ou duplicações descritas em indivíduos normais na DGV.

Validação dos resultados e estudo genético de familiares por qPCR

A validação dos resultados do *array*-CGH foi realizada pela técnica de qPCR. Esta validação é necessária quando são reportadas CNVs patogénicas ou provavelmente patogénicas, ou seja quando as CNVs são classificadas como I, II ou, em alguns casos, IIIA. Nestes casos, sempre que possível, é realizado também o estudo genético dos progenitores e/ou outros familiares, como irmãos que podem possuir a mesma alteração genética. A validação dos resultados e o estudo dos familiares são realizados simultaneamente no mesmo ensaio, pois o gene alvo é o mesmo e, assim, o número de cópias é imediatamente comparado entre o paciente e familiares. Para os ensaios de qPCR, utilizaram-se as sondas TaqMan® Copy Number Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e restantes reagentes da mesma marca.

As sondas TaqMan® são fragmentos de DNA marcados com um fluorocromo, que hibridizam especificamente com uma região de um gene ou sequência alvo. Quando o gene alvo é amplificado através de primers específicos, a sonda TaqMan®

emite fluorescência que é captada e que permite acompanhar a reação e quantificar os produtos da amplificação. Neste procedimento, como o objetivo é determinar o número de cópias de um gene alvo, é necessário utilizar um controlo endógeno em cada reação. Este controlo consiste na utilização de uma outra sonda que deteta a amplificação de um gene conhecido que possui sempre duas cópias num genoma diploide. Para os pacientes estudados foi utilizada uma sonda para o gene da RNase P.

Para cada ensaio, as sondas são escolhidas de acordo com a CNV reportada no resultado do *array*-CGH, sendo escolhido um gene que seja abrangido pela CNV em estudo. Em seguida, escolhe-se uma sonda TaqMan® específica para uma região do gene alvo. Esta escolha é feita informaticamente através do site da *Applied Biosystems* (<https://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/copy-number-variation.html>), onde é possível, através das coordenadas genómicas da CNV encontrada, definir o gene e as características desejadas para a sonda, de acordo com a sua localização e tamanho. Preferencialmente, é escolhida uma sonda exónica, pois os intrões são regiões mais variáveis e que apresentam mais polimorfismos, o que poderia dificultar a hibridação. Quanto ao tamanho, são escolhidas sondas com aproximadamente 100bp, devido ao facto de se realizarem várias reações com diferentes sondas na mesma placa de reação e, assim, as condições de hibridação são semelhantes entre os vários ensaios. O protocolo do qPCR encontra-se em anexo (Anexo 4).

Preparação das amostras

As amostras são inicialmente quantificadas no NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para determinar a concentração de cada amostra e medir as absorvâncias a 260nm e 280nm. O quociente A_{260nm}/A_{280nm} deve ser superior a 1.7. As amostras são em seguida diluídas para a concentração de 5ng/μL, pois deve-se utilizar a mesma quantidade de DNA genómico em todas as amostras e em cada réplica de amostra a testar no mesmo ensaio.

Desenho da experiência

A experiência é desenhada esquematizando a placa de reação a utilizar. Em cada estudo utilizam-se três réplicas de cada amostra de DNA (do paciente e familiares), sendo também necessário um controlo negativo, reação em que não é acrescentada qualquer amostra de DNA. Para cada paciente em estudo, são ainda realizadas duas reações controlo, em que se utilizam amostras de referência de origem masculina e feminina (as mesmas amostras controlo que se utilizam na técnica

de *array*-CHG). Utilizam-se sempre os dois controlos (masculino e feminino) pois estudam-se vários elementos da mesma família que podem ser de géneros diferentes e a utilização de um controlo de acordo com o género do indivíduo em estudo é importante quando se analisam alterações nos cromossomas sexuais. A utilização dos dois controlos em estudos de diferentes genes pode ainda ajudar a encontrar alterações no número de cópias de alguns genes que também podem ocorrer no DNA de referência masculino ou feminino, alterações estas que quando desconhecidas levam a dificuldades na interpretação dos resultados.

Configuração do *software*

Depois de desenhada a experiência, passa-se à configuração do *software* do aparelho de qPCR. O aparelho utilizado é o StepOnePlus™ Real Time PCR system e o *software* é o StepOne™ v2.2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No *software* define-se cada poço da placa de reação, identificando quais contêm DNA e o que serve de controlo negativo, aplicando um nome à amostra (utiliza-se o mesmo nome nas três réplicas) e ao gene alvo e incluindo as informações do corante de cada sonda. Define-se ainda o gene RNase P como controlo endógeno, os controlos masculino e feminino como amostras de referência e o volume final como 20µL.

Preparação das reações

Para cada reação é necessária a *TaqMan® Genotyping Master Mix*, composta pelos reagentes necessários a uma reação de PCR: *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)* e dNTPs. São ainda necessárias as sondas para amplificação e marcação dos genes amplificados. O *TaqMan® Copy Number Assay* contém dois *primers* e uma sonda marcada com fluorescência para detetar o gene alvo e o *TaqMan® Copy Number Reference Assay* contém igualmente dois *primers* e uma sonda, mas para detetar o gene da RNase P. Utiliza-se sempre 4µL da amostra de DNA previamente preparada a 5ng/µL. Os cálculos dos volumes de cada reagente devem ser feitos para o número de poços necessários e de acordo com os volumes necessários para cada reação (Tabela 4. A do Anexo 4).

Depois dos cálculos feitos, descongelam-se e agitam-se os reagentes e coloca-se o volume necessário de cada um em tubos de microcentrifuga. Inverte-se e centrifuga-se os tubos e, em seguida, distribui-se a mistura de reação pelos poços da placa. Por fim, adicionam-se as amostras de DNA aos respetivos poços. A placa é selada com adesivo óptico transparente e brevemente centrifugada.

Corrida das reações

Depois de preparada, a placa é inserida no aparelho de qPCR já configurado e são definidos os parâmetros da reação (Tabela 4. B do Anexo 4). As amostras são inicialmente mantidas a 95°C durante 10 minutos e, em seguida, sujeitas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Análise dos resultados

Depois da corrida, os resultados são inicialmente analisados no *software* StepOne™, onde por vezes são exibidas algumas bandeiras de verificação da qualidade que podem indicar erros, por exemplo, de pipetagem. Se for esse o caso, devem rever-se os dados das reações assinaladas e, se necessário eliminar dos resultados a réplica que apresenta o erro. Também devem ser observadas as curvas de amplificação do gene alvo e da RNase P.

Em seguida, os dados são exportados para o *software* de análise, o CopyCaller™ v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Neste *software* é necessário definir o controlo (masculino ou feminino) que possui duas cópias do gene alvo, tendo em atenção se a região em estudo se localiza num dos cromossomas sexuais. Para analisar o número de cópias de cada amostra, seleciona-se cada grupo de amostras (paciente e familiares), obtendo-se um gráfico que compara o número de cópias do gene em cada amostra com o controlo. Sendo que o número de cópias normal de um gene num genoma diploide é dois, é possível validar uma duplicação ou deleção (em heterozigotia) caso se verifiquem três ou apenas uma cópia do gene alvo, respetivamente.

Assim, é possível validar uma CNV encontrada por *array*-CGH no paciente e ainda verificar se algum progenitor possui a mesma alteração, indicando se esta ocorreu *de novo* ou é hereditária.

Interpretação da patogenicidade das CNVs

Após a validação das alterações encontradas e o estudo dos familiares, é necessário interpretar a patogenicidade das CNVs para que se chegue a um diagnóstico. As CNVs são classificadas como patogénicas, de significado clínico desconhecido (provavelmente patogénicas ou provavelmente benignas) ou benignas, tal como indicado pelas *guidelines* do *American College of Medical Genetics*⁵³. Para interpretar as CNVs é necessário ter em conta certos parâmetros como o tamanho da alteração e o seu conteúdo em genes. É também necessário verificar se a CNV em

questão é coincidente com uma região de alguma síndrome de microdeleção ou microduplicação já bem caracterizada.

Uma CNV é classificada como benigna quando já foi descrita em diversas publicações de revisão ou bases de dados como uma variante benigna e/ou se representa um polimorfismo comum (presente em >1% da população). É importante ter em atenção a natureza da CNV porque há casos em que uma duplicação pode ser benigna, mas uma deleção na mesma região pode ter relevância clínica e vice-versa.

Uma CNV é classificada como patogénica quando está bem documentada em diversas publicações como clinicamente relevante, mesmo que a sua penetrância e expressividade sejam variáveis. Nesta categoria inserem-se também CNVs de grande tamanho que, mesmo que não estejam descritas na literatura no tamanho observado, são coincidentes com um intervalo menor com significado clínico estabelecido. Estão ainda incluídas as alterações superiores a 3-5 Mb com significado clínico bem definido, com exceção dos heteromorfismos citogenéticos.

Quando no momento da interpretação, não existe informação suficiente para uma classificação precisa, as CNVs são classificadas como de significado clínico desconhecido. Esta é uma categoria bastante ampla e inclui as alterações que demonstram ser provavelmente patogénicas ou provavelmente benignas. Uma CNV de significado clínico desconhecido é provavelmente patogénica quando está descrita em apenas um caso, mas com fenótipo e localização bem definidos e em casos em que um gene abrangido pela CNV tem uma função relevante e específica para o fenótipo apresentado pelo paciente. No entanto, não se devem tirar conclusões a partir de dados resultantes apenas de modelos animais nem em casos em que a indicação do fenótipo não é específica e a informação quanto à função do gene é limitada. Uma CNV de significado clínico desconhecido é classificada como provavelmente benigna, quando não abrange qualquer gene mas apresenta um tamanho significativo e quando está descrita num pequeno número de casos em base de dados de variações na população geral, mas não representa um polimorfismo comum. Uma CNV é classificada como de significado clínico desconhecido (sem subclassificação) quando contém genes, mas não é conhecido se estes são sensíveis à dosagem e quando a CNV é reportada em várias publicações e/ou bases de dados contraditórias, sem que hajam conclusões claras acerca do seu significado clínico.

Para a interpretação das CNVs em que houve o estudo dos progenitores, é também importante ter em conta se a alteração é herdada ou se ocorreu *de novo*. No entanto, é difícil chegar a uma conclusão sobre a patogenicidade de uma CNV a partir do padrão de hereditariedade de uma só família e, por isso, devem ter sido em conta os resultados obtidos noutras famílias portadoras da mesma alteração.

Quando o resultado do estudo genético dos progenitores indica que a CNV ocorreu *de novo* no paciente, é mais provável que esta seja realmente a causa da patologia, principalmente quando a CNV já aparenta ter significado clínico baseado noutros parâmetros, como o conteúdo em genes. Se algum dos progenitores não estiver disponível para estudo genético e a CNV não for encontrada no progenitor estudado, não se podem tirar conclusões acerca da sua origem.

Quando a CNV é encontrada num dos progenitores, ou seja, é herdada, há vários parâmetros a ter em conta. Se o progenitor que é portador da CNV apresentar os mesmos sintomas clínicos que o paciente, é muito provável que a CNV seja a causa da patologia. Nos casos em que o progenitor portador não apresenta o mesmo fenótipo clínico, é mais difícil interpretar a patogenicidade da CNV. Apesar de ser mais facilmente concluído que a CNV não é a causa da patologia, deve-se ter atenção a vários aspetos. A CNV pode apresentar uma penetrância incompleta, ou seja, pode ser patogénica no paciente, mas não originar qualquer fenótipo no progenitor, assim como pode ser o caso de uma CNV com expressão variável, causando fenótipos com diferentes tipos de gravidade em pacientes distintos ou até sintomas com idades de início variáveis. Existem ainda outras situações mais raras, como por exemplo, a região da CNV ser uma região de *imprinting* genético, cujas alterações podem causar efeitos se herdados apenas de progenitores do sexo masculino ou feminino, como pode também existir uma segunda mutação não detetável por array-CGH e que afete a região da CNV, provocando o fenótipo no paciente. Podem também ocorrer situações em que a CNV não está presente em todos os tecidos do progenitor, sendo assim um mosaico que não leva à manifestação da doença. Existe também a possibilidade, ainda que muito rara, de que o tamanho da CNV do paciente não seja igual ao da CNV encontrada no progenitor devido a alguma modificação na transmissão da alteração (por exemplo, expansão da deleção). Deve ainda ser dada atenção especial às CNVs presentes no cromossoma X, pois nas mulheres, devido ao padrão de inativação preferencial do cromossoma X, a CNV pode não se manifestar da mesma forma que se manifesta num portador masculino.

Depois de analisados todos estes parâmetros, as CNVs são classificadas de maneira a que, sempre que possível, se chegue a um diagnóstico que permita um aconselhamento genético adequado a cada paciente e respetiva família.

Capítulo IV Resultados e Discussão

Através do estudo por *array*-CGH em 121 pacientes com atraso mental síndrómico ou não síndrómico e/ou défice cognitivo, foram detetadas CNVs patogénicas (classificadas como I) em 15 indivíduos e provavelmente patogénicas (classificadas como II) em 11. Adicionalmente em 21 destes 26 casos, foram encontradas CNVs classificadas como IIIA, que serão também apresentadas e discutidas em cada caso. Em anexo encontra-se uma tabela onde estão descritas todas as alterações patogénicas e provavelmente patogénicas encontradas (Anexo 5).

As CNVs patogénicas e provavelmente patogénicas que foram encontradas nos 26 pacientes distribuem-se pelos cromossomas 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17 e 22. Se forem englobadas as alterações classificadas como IIIA, é possível dizer que todos os cromossomas, à exceção do 19, estão aqui representados. É de salientar que o cromossoma 16 é aquele em que foi detetado um maior número de alterações, com três CNVs patogénicas e duas provavelmente patogénicas, sugerindo que este cromossoma e os genes que contém têm um papel importante nas patologias mentais e cognitivas. É importante referir também que, neste estudo, as deleções são mais frequentes do que as duplicações, tanto nas CNVs patogénicas como nas provavelmente patogénicas. Quanto à relação destas patologias com o género dos indivíduos, neste estudo não se verifica a prevalência de indivíduos do sexo masculino, como é sugerido na literatura disponível, tendo-se observado um rácio de 50/50 entre os géneros dos pacientes em que foram detetadas CNVs patogénicas ou provavelmente patogénicas. Um outro facto que deve ser salientado consiste na origem das CNVs encontradas, uma vez que, naquelas em que foi possível estudar os dois progenitores do paciente em causa, em nenhuma se determinou uma origem *de novo*. Assim, é possível sugerir que as CNVs que originam este tipo de patologias apresentam níveis de penetrância muito variáveis.

Em seguida, são descritos os 26 casos de pacientes em que foram encontradas CNVs patogénicas e provavelmente patogénicas.

Alterações patogénicas (I)

Caso 1

Trata-se de um paciente do sexo masculino de 24 anos, com indicação clínica de atraso mental e síndrome polimalformativa. Através da técnica de *array*-CGH foram encontradas duas alterações, das quais, uma foi classificada como I e outra como IIIA. Foi encontrada uma deleção (I) na região 6q25.3 com aproximadamente 219 kb, envolvendo o gene *ARID1B* (Figura 5).

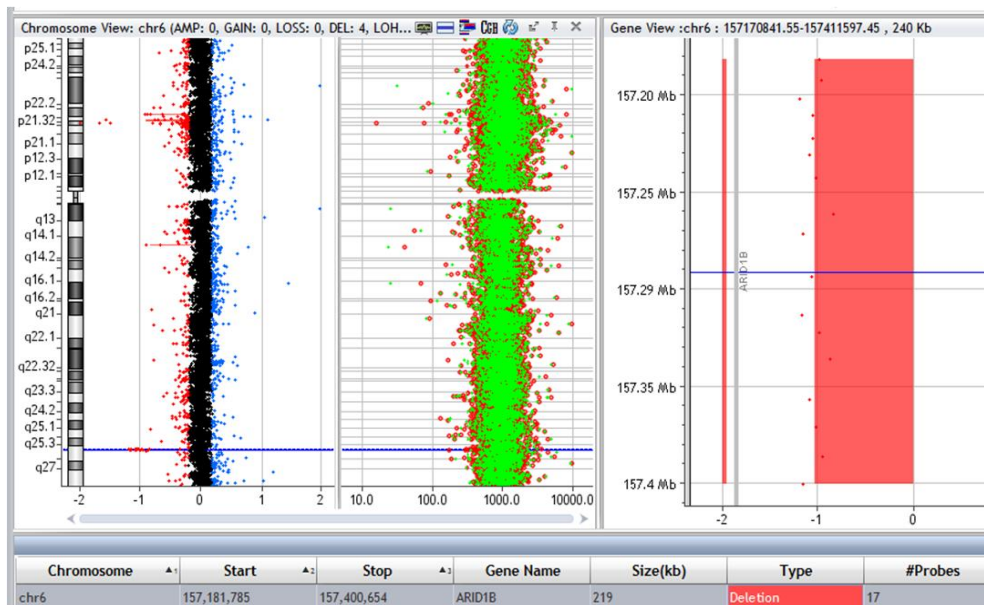


Figura 5 – Resultado do *array*-CGH no caso 1, demonstrando a deleção na região 6q25.3 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Esta alteração que envolve o gene *ARID1B* (*AT-rich interactive domain-containing protein 1B*) (OMIM *614556) é coincidente com algumas alterações reportadas no DECIPHER e que indicam fenótipos como atraso mental, autismo, atraso no desenvolvimento do discurso e da linguagem, dismorfias faciais, entre outros. No OMIM, o gene *ARID1B* está também associado ao fenótipo de atraso mental (OMIM #614562).

O gene *ARID1B* codifica uma proteína que faz parte de um complexo BAF (*Brahma associated factor*), com função de remodelação da cromatina⁵⁴. Estes complexos modificam a estrutura da cromatina, alterando a acessibilidade dos reguladores da transcrição. O complexo BAF faz parte da classe dos SWI/SNF (*switch/sucrose nonfermentable*), uma classe de complexos remodeladores da cromatina que utiliza a energia da hidrólise do ATP e é constituído por várias subunidades que, combinadas diferencialmente, formam complexos diferentes com funções diversas e especificidade biológica. A subunidade característica do complexo

BAF é o ARID1, que se divide em ARID1A e ARID1B, duas subunidades mutuamente exclusivas. Estas proteínas partilham mais de 60% de identidade e a sua característica principal é a presença de um domínio ARID de ligação ao DNA, que não mostra especificidade para nenhuma sequência. Alterações neste domínio da proteína prejudicam as propriedades de ligação ao DNA, comprometendo a função do complexo BAF. A proteína *ARID1B* tem aproximadamente 250 kDa, e apresenta uma localização nuclear. A remodelação da cromatina dependente de ATP é importante na regulação da proliferação e diferenciação celular, existindo estudos que demonstram a importância deste processo para o desenvolvimento neuronal e que mostram a importância do complexo BAF na regulação do ciclo celular. Alterações nos genes que codificam subunidades destes complexos têm sido recentemente associadas a doenças do desenvolvimento e cancro⁵⁴. Flores-Alcantar *et al.* mostraram que o gene *ARID1B* é predominantemente expresso nos tecidos neuronais e sugerem que é importante no desenvolvimento inicial do cérebro quando as células neuroepiteliais multipotentes estão em proliferação⁵⁵. Outros estudos demonstraram que a haploinsuficiência deste gene diminui a função dos complexos BAF, prejudicando assim a expressão de genes importantes para a entrada no ciclo celular⁵⁶, realçando assim a sua importância na regulação do ciclo celular durante a diferenciação. Está também demonstrada a importância dos complexos BAF no desenvolvimento neuronal e na diferenciação das células nervosas^{57; 58}, por isso a haploinsuficiência de *ARID1B* leva ao atraso na entrada do ciclo celular das células progenitoras neuronais e afetando o desenvolvimento cerebral, o que pode explicar o fenótipo de atraso mental que é frequentemente encontrado nos indivíduos com alterações neste gene⁵⁴.

As CNVs envolvendo o gene *ARID1B* nomeadamente deleções heterozigóticas, são das alterações mais frequentemente reportadas nesta região genómica⁵⁴. A variabilidade de fenótipos manifestados por pacientes com estas CNVs é muito elevada, no entanto, duas características frequentemente observadas são atraso mental e no desenvolvimento do discurso e da linguagem. Apesar de ainda não existir uma correlação entre os fenótipos observados e alterações específicas no gene *ARID1B*, é evidente que as manifestações clínicas destes pacientes derivem predominantemente da haploinsuficiência deste gene.

O primeiro caso de uma alteração da região do gene *ARID1B* foi reportado em 1998, quando Pirola *et al.* descreveram uma deleção na região 6q25 numa paciente que apresentava agenesia do corpo caloso, atraso psicomotor e hipotonia⁵⁹. Mais tarde, em 2009, Nagamani *et al.*, reportaram quatro casos de pacientes com deleções na mesma região envolvendo vários genes, entre os quais o *ARID1B*. Todos os pacientes apresentavam microcefalia, atraso no desenvolvimento, dismorfias e perda

da audição, sendo que dois dos quais apresentavam ainda agenesia do corpo caloso⁶⁰. Em 2011, Nord *et al.* descreveram um indivíduo com autismo e com uma deleção em 3 exões do gene *ARID1B*⁶¹. Em 2012, foi encontrada haploinsuficiência do gene *ARID1B* em quatro indivíduos com atraso mental, autismo, anomalias do corpo caloso e atraso no desenvolvimento da linguagem⁶². Ainda no mesmo ano, Hoyer *et al.*, encontraram haploinsuficiência do gene em oito indivíduos não síndrómicos com atraso mental idiopático⁶³. A haploinsuficiência de *ARID1B* foi ainda identificada em indivíduos com Síndrome de Coffin-Siris, que se caracteriza por atraso mental, atraso no desenvolvimento, nomeadamente da linguagem e microcefalia⁶⁴⁻⁶⁶. Em 2014, foram reportados também alguns casos de deleções no *ARID1B*, como por exemplo, um paciente com fenótipo sobreponível ao da Síndrome de Coffin-Siris, mas com características adicionais como dismorfias faciais, que demonstrou haploinsuficiência do gene *ARID1B*⁶⁷.

Foi realizado o qPCR para validação da deleção e para o estudo da mãe deste paciente, visto ser o único familiar disponível. Foi utilizada uma sonda específica para uma região do gene *ARID1B*, entre o intrão 4 e o exão 5. No paciente, foi validada a deleção do gene, observando-se apenas uma cópia, enquanto que na mãe foram observadas duas cópias do gene, concluindo assim que esta alteração não foi herdada da mãe (Figura 6). No entanto, como não foi realizado o estudo genético do pai do paciente, não é possível concluir se esta alteração ocorreu *de novo*.

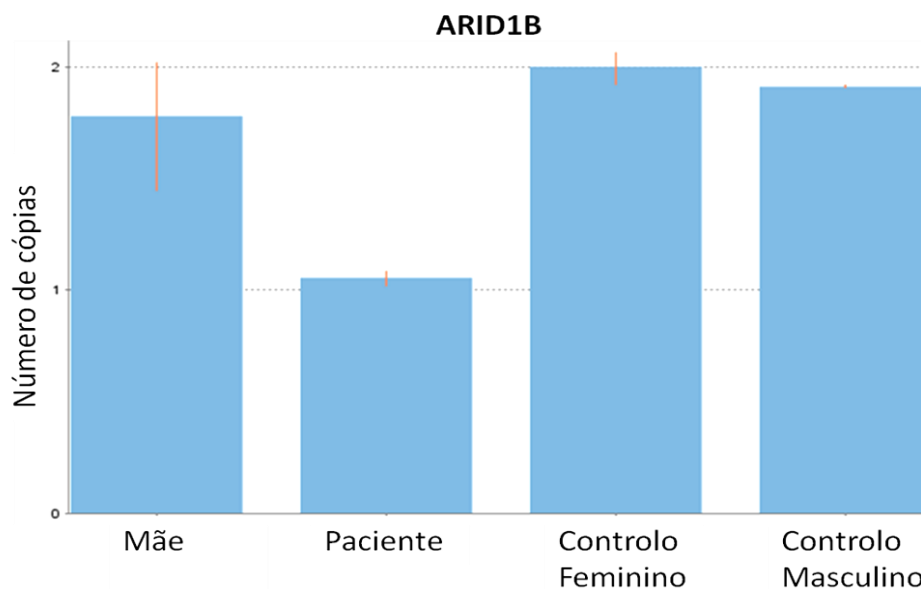


Figura 6 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *ARID1B* determinadas no paciente 1 e na sua mãe, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Mesmo sem se chegar à conclusão da origem da CNV, é provável que esta alteração seja responsável pelo fenótipo apresentado pelo paciente, devido aos vários casos reportados com manifestações clínicas semelhantes e à sua forte presença nas bases de dados de alterações patogénicas.

Neste paciente foi ainda encontrada uma outra alteração no cromossoma 9, que foi classificada como IIIA, que consiste numa deleção na citobanda 9p24.3, com aproximadamente 48 kb e que abrange o gene *KANK1* (Figura 7).

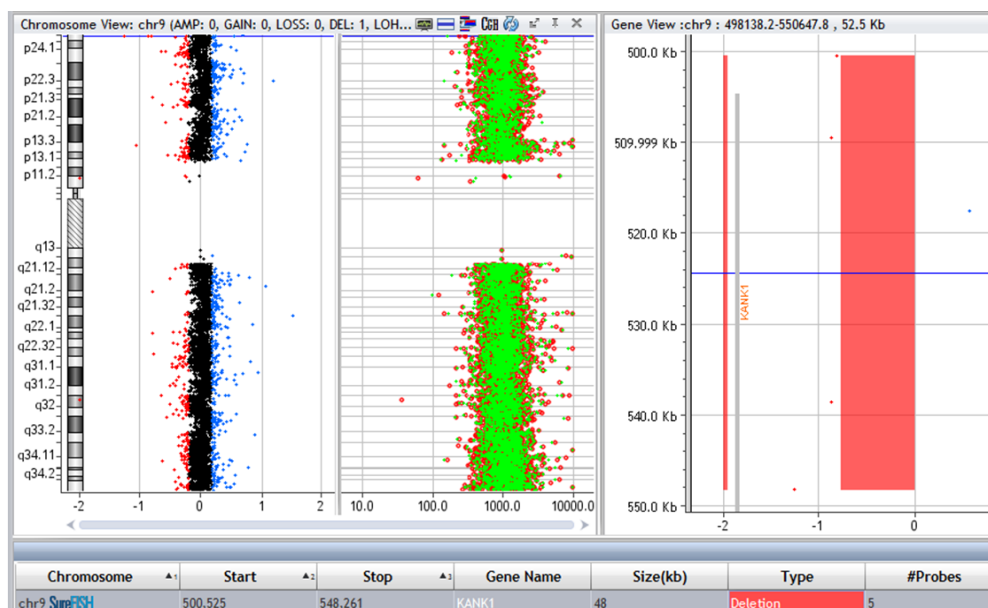


Figura 7 – Resultado do array-CGH no caso 1, demonstrando a deleção na região 9p24.3 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

O gene *KANK1* (*KN motif and ankyrin repeat domains 1*) (OMIM *607704) está presente na base de dados do OMIM por estar associado a paralisia cerebral quadriplégica esplástica (OMIM #612900) e a vários níveis de atraso mental presentes numa família com vários indivíduos afetados, mas apenas quando a alteração é transmitida por via paterna. Este estudo sugere que o gene sofre *imprinting* materno e que apenas é expresso o alelo paterno⁶⁸. No entanto, existe outro estudo que reporta o caso de uma família onde também está presente uma deleção do gene *KANK1*, mas que não aparenta estar sujeita ao *imprinting* materno anteriormente sugerido, concluindo que esta alteração poderá ter outro padrão de hereditariedade, sugerindo até que pode apresentar uma penetrância incompleta⁶⁹.

Neste caso, foi também realizado o qPCR para validação desta alteração e estudo genético da mãe. Através desta técnica foi possível validar a alteração no paciente em estudo e ainda concluir que a mãe é portadora da mesma deleção, apresentando também uma cópia do gene *KANK1* (Figura 8). No entanto, não é

possível tirar conclusões acerca dos efeitos desta alteração no fenótipo do paciente em estudo, pois os dados bibliográficos não suportam uma hipótese clara para um padrão de transmissão e porque, tendo em conta a informação clínica disponível do paciente, o fenótipo em estudo não se parece sobrepor totalmente ao fenótipo apresentado nos casos reportados com a mesma alteração.

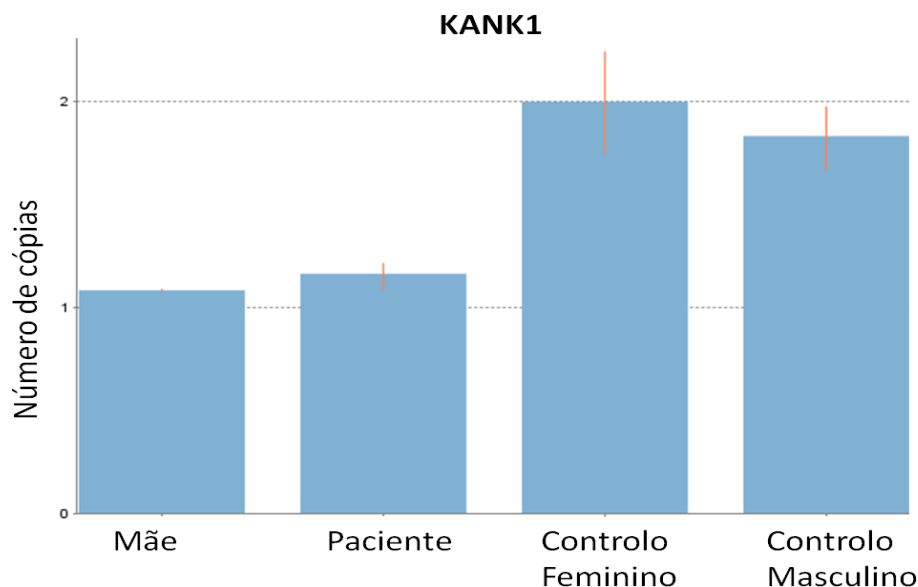


Figura 8 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene KANK1 determinadas no paciente 1 e na sua mãe, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Caso 2

Neste caso, a paciente apresenta défice cognitivo, sem dismorfias e deu entrada no serviço de genética aos 18 anos. Adicionalmente, a história familiar refere um irmão com dificuldades de aprendizagem. Após *array*-CGH encontrou-se uma alteração classificada como I, uma deleção na região 15q11.2 com aproximadamente 443 kb e envolvendo os genes *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2*, *NIPA1* e *WHAMML1* (Figura 9).

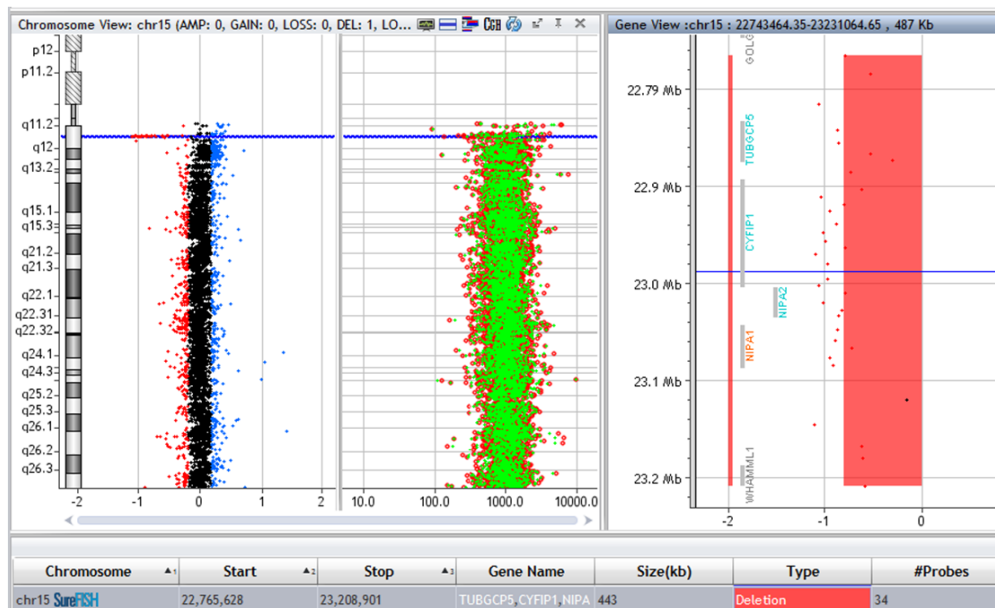


Figura 9 – Resultado do array-CGH no caso 2, demonstrando a deleção na região 15q11.2 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

A deleção no cromossoma 15 coincide com a região de deleção que é observada nas síndromes de Angelman e Prader-Willi, no entanto o fenótipo da paciente não coincide com as manifestações clínicas características destas síndromes. Este aspeto é explicado pelo facto da deleção na paciente ser de tamanho muito inferior em comparação com as deleções encontradas nestas síndromes, não abrangendo tantos genes. No OMIM foi já descrita a síndrome de deleção 15q11.2 (OMIM #615656), que se caracteriza por uma deleção de 300 a 500 kb na mesma região das síndromes Angelman e Prader-Willi e que inclui quatro genes não sujeitos a efeitos de *imprinting*. Estes genes envolvidos nesta síndrome são o *TUBGCP5* (OMIM *608147), *NIPA1* (OMIM *608145), *NIPA2* (OMIM *608146) e *CYFIP1* (OMIM *606322), ou seja, os mesmos que foram encontrados na região deletada do paciente em estudo. As deleções nesta região têm sido associadas a várias alterações no neurodesenvolvimento, tais como atraso mental, atraso no discurso e na linguagem, atraso motor, doenças do espectro autista, epilepsia e esquizofrenia. Cafferkey *et al.*, que estudou a presença desta alteração num grupo de doentes referenciados para análise genética, demonstrou que todos os tipos de atraso no desenvolvimento foram encontrados com maior frequência nos portadores da deleção 15q11.2 do que nos pacientes sem esta deleção e sugeriu ainda que esta alteração não está associada a características dismórficas⁷⁰. O fenótipo encontrado na nossa paciente é sobreponível ao descrito por Cafferkey *et al.* Esta CNV apresenta uma penetrância incompleta, sendo que em 51% dos casos, a alteração é herdada de um progenitor aparentemente não afetado. Estes baixos níveis de penetrância podem ser explicados pela existência

de manifestações subclínicas de problemas comportamentais ou neuropsiquiátricos presentes nos progenitores⁷¹.

A função e expressão dos genes presentes na região deletada são compatíveis com o fenótipo de défice cognitivo apresentado pela paciente em estudo. O *TUBGCP5* (*Tubulin complex-associated protein 5*) é importante na nucleação e organização dos microtúbulos⁷². A proteína codificada pelo *CYFIP1* (*Cytoplasmic FMRP-interacting protein 1*) interage com a proteína FMRP, envolvida na síndrome do X-frágil, distribuindo-se pelo citoplasma e ribossomas⁷³. Esta proteína interage também com a GTPase RAC1, que está implicada no desenvolvimento das estruturas neuronais⁷⁴. O gene *NIPA1* (*Non-Imprinted in PWS/AS syndrome region 1*) codifica um transportador intracelular de magnésio e apresenta elevada expressão no tecido neuronal⁷⁵. O gene *NIPA2* (*Non-Imprinted in PWS/AS syndrome region 2*) codifica uma proteína de transporte membranar com expressão no sistema nervoso central⁷⁶.

Neste caso, foi realizado o qPCR para validação da alteração na paciente e para estudo dos familiares disponíveis, a mãe, uma irmã e um irmão, gémeos entre si. Foi utilizada uma sonda para o exão 3 do gene *TUBGCP5*. Tanto no paciente, como na sua mãe e irmão, foi encontrada uma cópia do gene, demonstrando que a deleção também está presente nestes familiares e apenas a irmã apresenta duas cópias do gene (Figura 10). Estes resultados estão em concordância com a baixa penetrância que caracteriza esta CNV, pois causa diferentes fenótipos nos membros desta família. De acordo com as informações clínicas disponíveis, o irmão apresenta dificuldades na aprendizagem, sendo que a mãe apresenta um fenótipo aparentemente normal.

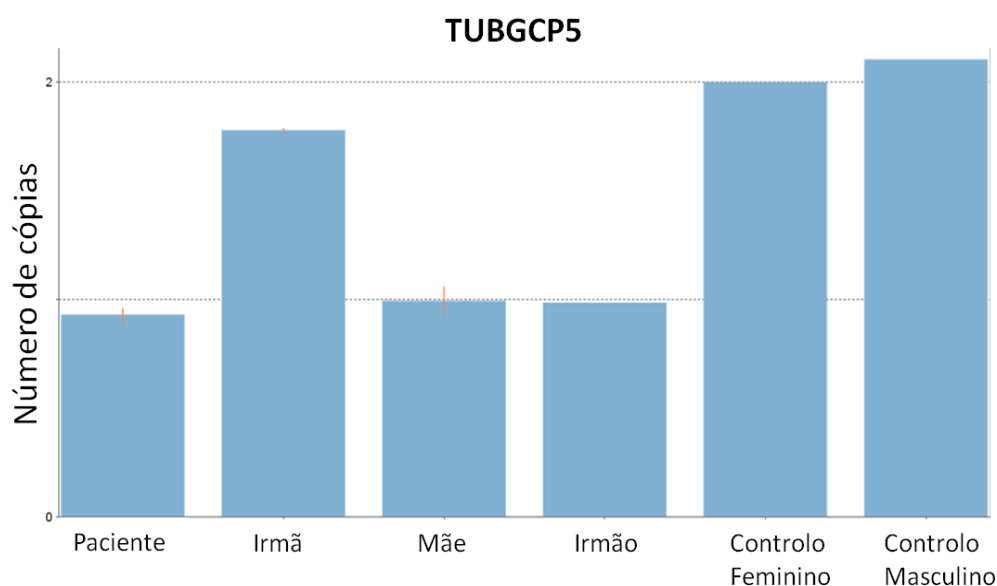


Figura 10 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do software CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *TUBGCP5* determinadas no paciente 2 e nos seus familiares, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Foram ainda encontradas outras duas alterações classificadas como IIIA, sendo as duas duplicações. Uma duplicação na citobanda 3q23 de 87 kb que atinge o gene *RASA2* e uma duplicação na citobanda 18p11.22 de 366 kb afetando os genes *ANKRD12*, *TWSG1* e *RALBP1*.

Quanto à duplicação no cromossoma 18, não se encontra na DGV nem no DECIPHER, no entanto engloba o gene *ANKRD12* (*ankyrin repeat domain 12*) (OMIM *610616) que é conhecido por ser expresso no cérebro⁷⁷. A alteração no cromossoma 3 envolve o gene *RASA2* (*RAS p21 protein activator 2*) (OMIM *601589) que também se sabe ser expresso no cérebro⁷⁸. Assim, não é possível excluir um possível papel patogénico destas alterações para o fenótipo do doente.

Caso 3

Neste caso é descrito um paciente de 8 anos de idade com défice cognitivo, epilepsia e pé boto. Através de *array*-CGH, foi encontrada uma alteração patogénica (I), uma deleção na região 15q11.2 de aproximadamente 244 kb, afetando os genes *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* e *NIPA1* (Figura 11).

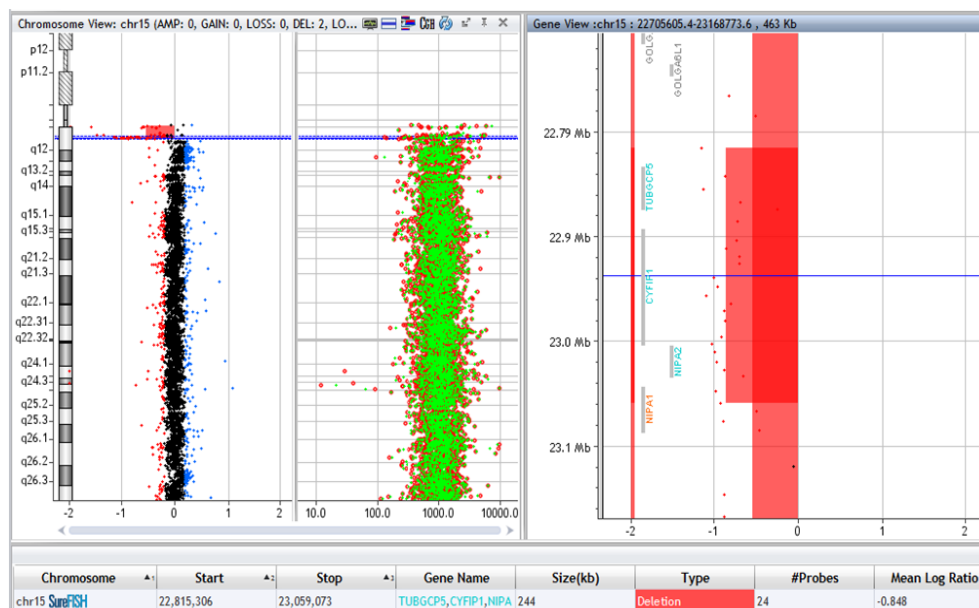


Figura 11 – Resultado do *array*-CGH no caso 3, demonstrando a deleção na região 15q11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

A síndrome de deleção 15q11.2 foi já descrita no caso 2 e está relacionada a várias alterações do neurodesenvolvimento, incluindo atraso no desenvolvimento psico-motor e da linguagem e epilepsia, assemelhando-se aos sintomas apresentados pelo paciente. Neste caso, não foi possível a realização do qPCR para validação nem para estudo dos familiares, no entanto, devido à patogenicidade desta CNV

comprovada na literatura, assumiu-se que esta alteração é responsável pelo fenótipo clínico do paciente.

Neste paciente, foi encontrada também uma alteração classificada com IIIA, que consiste numa duplicação da região 5q23.3 com 216 kb e que atinge o gene *CHSY3*. Esta alteração não está presente na DGV e encontra-se reportada em alguns casos do DECIPHER, sendo associada a epilepsia e atraso mental. Com estes dados, é essencial também considerar esta CNV como possível responsável pelo fenótipo do doente, atuando os seus efeitos juntamente com os da alteração anteriormente referida.

Caso 4

Este paciente do sexo masculino iniciou estudo genético aos 11 anos de idade devido à presença de défice cognitivo, sem dismorfias. Através de *array*-CGH, foi detetada uma duplicação patogénica (I) na região 17q12 de aproximadamente 1392 kb, envolvendo os genes *PIGW*, *GGNBP2*, *LHX1*, *AATF*, *ACACA*, *DUSP14*, *DDX52*, *HNF1B*, *ZNHIT3*, *MYO19*, *DHRS11*, *MRM1*, *MIR2909*, *C17orf78*, *TADA2A*, *SYNRG* e *LOC284100* (Figura 12).

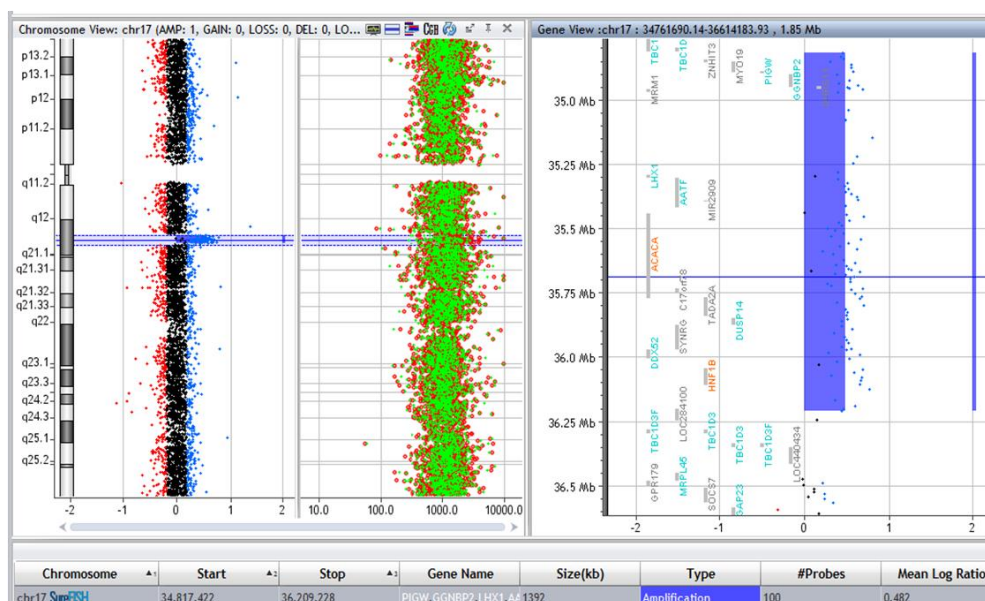


Figura 12 – Resultado do *array*-CGH no caso 4, demonstrando a duplicação na região 17q12 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER, a duplicação desta região está reportada em vários casos com fenótipos clínicos como défice cognitivo, microcefalia, atraso mental, anomalias faciais, atraso no desenvolvimento do discurso e da linguagem, hipotonia. No OMIM está descrita como síndrome de duplicação 17q12 (OMIM #614526). Esta duplicação é rara na população normal, ocorre geralmente por NAHR e tem sido associada a fenótipos

muito variáveis de atraso mental, desde dificuldades de aprendizagem a atrasos severos no desenvolvimento, sendo em alguns casos acompanhado de epilepsia e distúrbios comportamentais. Em alguns casos reportados, esta CNV é herdada de um progenitor sem manifestações clínicas aparentes, demonstrando também uma penetrância incompleta⁷⁹⁻⁸¹. O gene que tem sido destacado como responsável pelo atraso mental associado a esta duplicação é o *LHX1* (*LIM Homeobox Gene 1*) (OMIM *601999), que codifica um membro da família de proteínas que contém um domínio LIM, um domínio de ligação ao zinco rico em cisteínas. Este gene é expresso no cérebro e estudos feitos com ratinhos mostraram que é importante para o desenvolvimento das células de Purkinje no cerebelo, assim como, para a migração dos neurónios motores^{82; 83}. Assim, este gene parece estar envolvido no normal desenvolvimento do cérebro⁸⁰.

Neste caso, a alteração foi validada com recurso à técnica de qPCR utilizando uma sonda específica para o exão 2 do gene *LHX1*, sendo também realizado o estudo dos progenitores do paciente, pela mesma técnica. Foi observado que a mãe do paciente possui a mesma duplicação, apresentando três cópias do gene, enquanto o pai apresenta um genótipo normal com duas cópias (Figura 13). Mesmo sendo uma alteração herdada de um progenitor saudável, segundo informações clínicas, esta alteração é patogénica e os dados recolhidos da literatura suportam a sua responsabilidade pelo atraso cognitivo apresentado por este paciente.

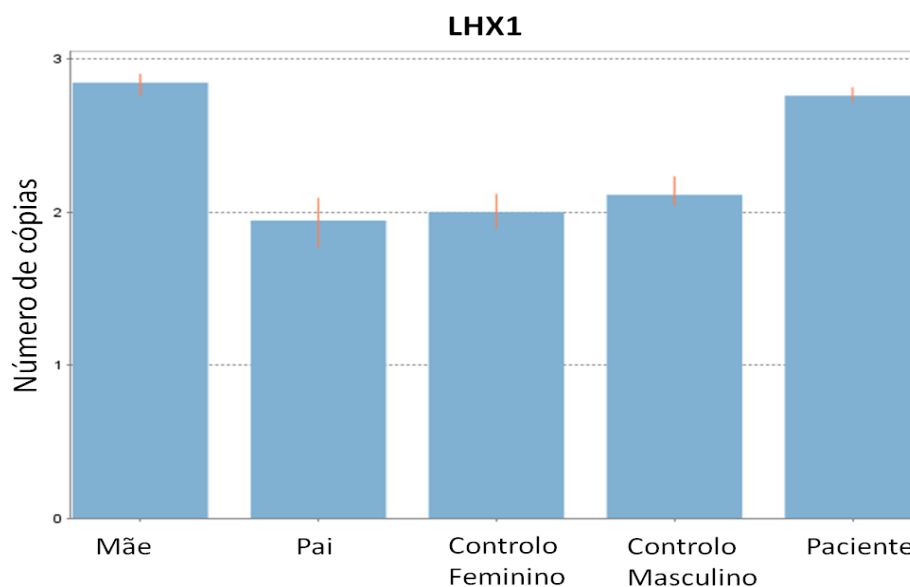


Figura 13 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *LHX1* determinadas no paciente 4 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.

No mesmo paciente foram ainda encontradas duas duplicações classificadas como IIIA, na região 1q21.1, envolvendo os genes *PDZK1*, *RNF115* e *CD160* e na região 7p22.1, que envolve os genes *ZNF12*, *RAC1*, *DAGLB*, *KDELR2*, *GRID2IP*, *ZDHHC4*, *C7orf26*, *ZNF853* e *PMS2CL*.

A duplicação no cromossoma 1 está descrita com baixa frequência na DGV. No DECIPHER, duplicações desta região estão associadas a atraso mental, atraso no desenvolvimento da linguagem, autismo, entre outros fenótipos. Quando à duplicação no cromossoma 7, não está presente na DGV e no DECIPHER estão descritos casos de atraso mental e atraso no desenvolvimento em indivíduos com duplicações na mesma região. No entanto, até à data ainda nenhum dos genes envolvidos nestas CNVs foi fortemente associado a atraso cognitivo, não sendo possível concluir acerca da patogenicidade destas CNVs.

Caso 5

O caso 5 refere-se a um paciente de 14 anos que apresenta défice cognitivo. Neste paciente foi apenas encontrada uma alteração patológica (I) que consiste numa deleção na região 17q12 com 1793 kb que envolve os genes *TBC1D3B*, *CCL3L1*, *CCL4L2*, *TBC1D3C*, *TBC1D3H*, *TBC1D3G*, *PIGW*, *GNBP2*, *LHX1*, *AATF*, *ACACA*, *DUSP14*, *DDX52*, *HNF1B*, *CCL3L3*, *CCL4L1*, *ZNHIT3*, *MYO19*, *DHRS11*, *MRM1*, *MIR2909*, *C17orf78*, *TADA2A*, *SYNRG* e *LOC284100* (Figura 14). No paciente do caso 4 foi já descrita uma alteração nesta região que consistia numa duplicação de menor tamanho do que a deleção encontrada neste paciente.

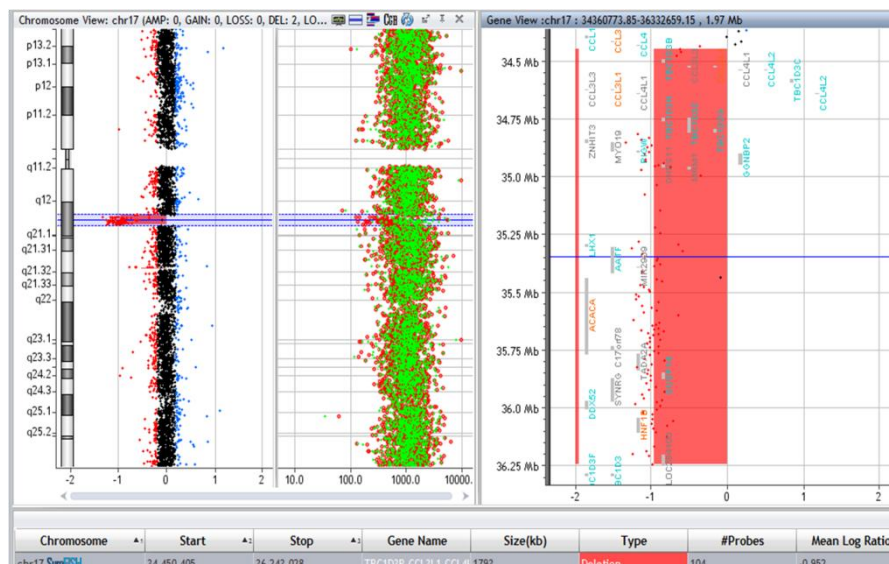


Figura 14 - Resultado do array-CGH no caso 5, demonstrando a deleção na região 17q12 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Esta alteração está descrita em vários pacientes no DECIPHER, os quais apresentam fenótipos de atraso mental, anomalias no sistema nervoso periférico, atraso global do desenvolvimento e autismo. A síndrome de deleção 17q12 aparece também como uma síndrome reconhecida no OMIM (OMIM #614527). Inicialmente, esta deleção estava associada a alterações renais, diabetes, atrofia pancreática e aplasia mulleriana. Mais recentemente, vários autores já demonstraram que as deleções desta região são também responsáveis por atraso mental, autismo, esquizofrenia e outras patologias relacionadas com o neurodesenvolvimento⁸⁴⁻⁸⁸. Tal como já tinha referido no caso 4, o gene *LHX1* (*LIM Homeobox Gene 1*) está envolvido no desenvolvimento do cérebro e, por isso, tem sido associado ao atraso mental^{85; 86}.

Neste caso não foi possível a realização do qPCR para estudo genético dos progenitores, no entanto, mesmo sem saber qual a origem da alteração, é possível concluir, com base nos dados bibliográficos, nos casos reportados e no seu conteúdo génico, que esta alteração é patogénica e está associada ao fenótipo de défice cognitivo no paciente em estudo.

Caso 6

Este caso refere-se a uma paciente que apenas foi referenciada para análise genética aos 65 anos. Apresentava atraso cognitivo, baixa estatura e fácies síndrómica. No array-CGH detetou-se uma deleção patogénica (I) da região 15q26.2qter com 4711 kb e envolvendo os genes *LOC91948*, *ARRDC4*, *FAM169B*, *IGF1R*, *PGPEP1L*, *SYNM*, *TTC23*, *LRRC28*, *MEF2A*, *LYSMD4*, *DNM1P46*, *ADAMTS17*, *FLJ42289*, *LASS3*, *LINS*, *ASB7*, *ALDH1A3*, *LRRK1*, *CHSY1*, *SELS*, *SNRPA1*, *PCSK6*, *TM2D3*, *TARSL2*, *OR4F6*, *OR4F15* e *GPCRLTM7* (Figura 15).

Trata-se de uma deleção muito extensa que não está descrita na DGV e que se encontra reportada com muita frequência na base de dados do DECIPHER. Deleções desta região estão associadas a atraso mental, baixa estatura, anomalias faciais, atraso no desenvolvimento da linguagem, entre outros. Os fenótipos descritos no DECIPHER coincidem com a informação clínica da paciente em estudo. No OMIM está descrita a síndrome de deleção 15q26-qter (OMIM #612626). Vários casos já foram reportados com esta síndrome e as alterações mais frequentes são atraso no crescimento, baixa estatura, anomalias faciais, atraso mental, microcefalia. Um dos genes responsáveis por estes fenótipos é o *IGF1R* (*insulin-like growth factor 1 receptor*) (OMIM *147370) que tem um papel importante no crescimento do esqueleto, no metabolismo dos carboidratos e no desenvolvimento do cérebro e, por isso, tem sido apontado como responsável pelo atraso do crescimento e baixa estatura observados nos indivíduos com esta alteração⁸⁹⁻⁹². Neste caso não foi possível a

realização do qPCR para validação da alteração e para estudo de familiares, no entanto, a patogenicidade da alteração é bem suportada pela literatura, concluindo-se que esta CNV é responsável pelo fenótipo desta paciente.

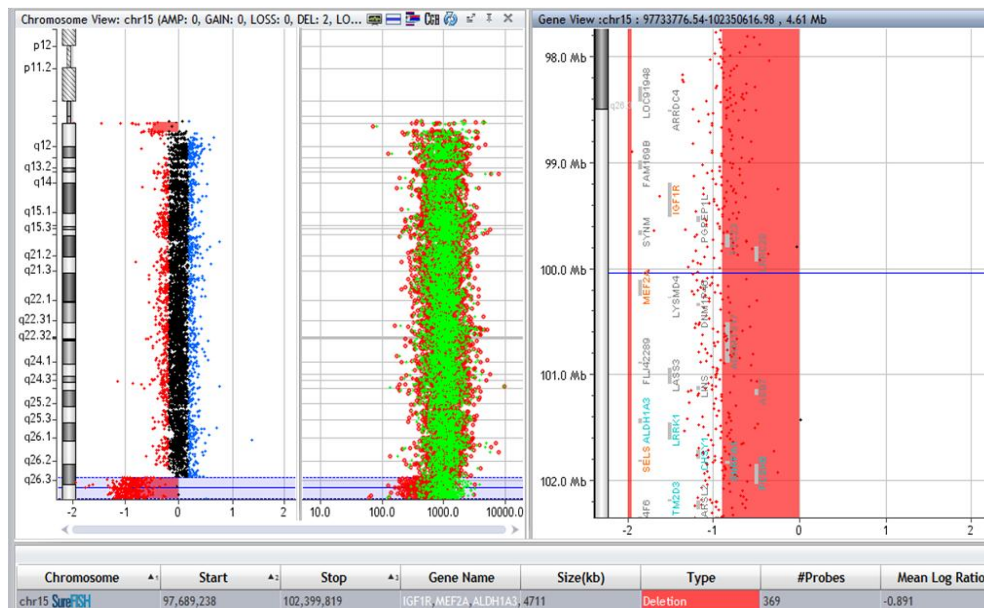


Figura 15 – Resultado do array-CGH no caso 6, demonstrando a deleção na região 15q26.2qter e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Neste caso foram ainda encontradas três alterações classificadas como IIIA: uma deleção na região 3p14.2 com 178 kb, que inclui o gene *FHIT*; uma deleção na região 10q11.21 de 125 kb envolvendo o gene *LOC220980* e ainda uma deleção na região 21p11.2 de 1034 kb que afeta o gene *LOC100132288*.

Destas alterações, apenas a deleção no cromossoma 3 está presente na DGV, mas com baixa frequência. No DECIPHER apenas estão descritas deleções na região do cromossoma 3, de entre as regiões cromossómicas referidas acima, reportando atraso cognitivo e no desenvolvimento como manifestações fenotípicas e o gene *FHIT* (*fragile-histidine triad*) (OMIM *601153) tem vindo a ser associado a perturbações do espectro do autismo^{93; 94}. Estas alterações podem estar relacionadas com os sintomas presentes nesta paciente, no entanto, não é possível obter uma conclusão clara sobre a patogenicidade destas alterações.

Caso 7

Este caso refere-se a uma paciente que foi referenciada para estudo genético aos 15 anos e que apresentava um síndrome dismórfico com défice cognitivo, CIV (Comunicação Interventricular) e baixa estatura. Nesta paciente foram encontradas duas alterações patogénicas (I). Foi encontrada uma duplicação na região 8p23.1-pter

com 6762 kb, envolvendo os genes *FBXO25*, *DLGAP2*, *CLN8*, *ARHGEF10*, *MYOM2*, *CSMD1*, *MCPH1*, *ANGPT2*, *DEFB1*, *DEFA6*, *DEFA4*, *DEFA1*, *DEFA5*, *RPL23AP53*, *ZNF596*, *C8orf42*, *ERICH1*, *LOC286083*, *MIR596*, *KBTBD11*, *AGPAT5*, *XKR5*, *DEFA10P*, *DEFA1B*, *DEFT1P*, *DEFT1P2* e *DEFA3* (Figura 16).

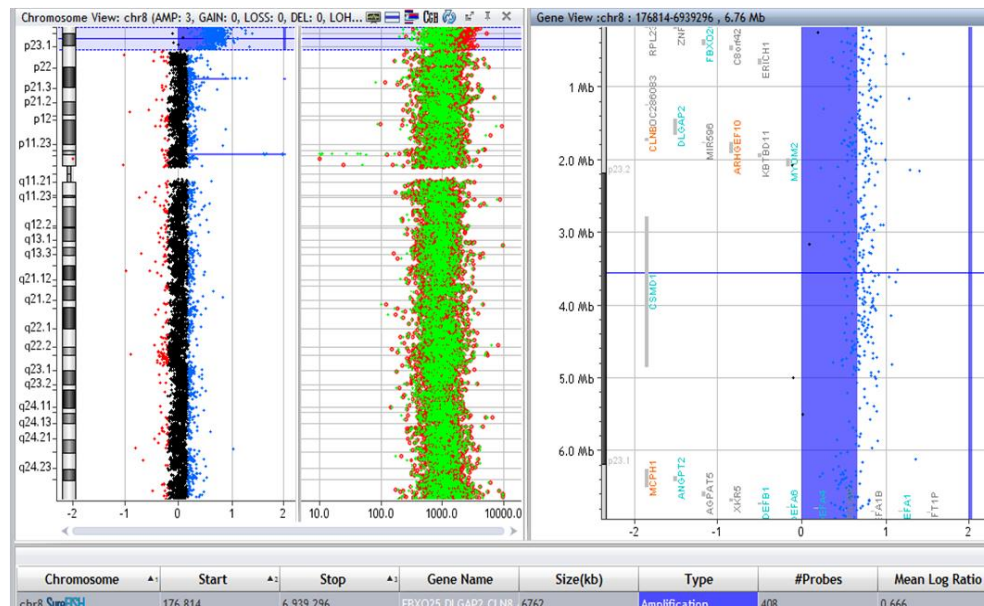


Figura 16 – Resultado do array-CGH no caso 7, demonstrando a duplicação na região 8p23.1-pter e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER estão descritos vários casos de duplicações desta região com fenótipos variáveis, entre os quais, atraso do desenvolvimento geral, atraso mental, malformações no coração, anomalias faciais, defeito no septo atrial, defeito no septo ventricular e baixa estatura, correspondendo às características apresentadas pela paciente deste estudo.

As grandes duplicações no braço curto do cromossoma 8 são frequentemente associadas a inversões da região duplicada e já foram reportadas em casos de atraso mental, dismorfismos faciais, agenesia do corpo caloso e outros problemas como doenças do coração^{95; 96}, no entanto, a técnica de array não permite distinguir este tipo de rearranjos cromossômicos. Um dos genes desta região cujas alterações de dosagem têm sido associadas ao autismo acompanhado de atraso mental é o *MCPH1* (*microcephalin* 1) (OMIM *607117), que é expresso no córtex cerebral em desenvolvimento no feto, onde atua, em conjunto com outros genes, como um regulador específico do tamanho do cérebro^{95; 97; 98}.

A outra alteração observada foi uma deleção na citobanda 11q24.2-qter de 10409 kb, que abrange os genes *NRGN*, *ROBO3*, *ROBO4*, *HEPN1*, *HEPACAM*, *PKNOX2*, *FEZ1*, *EI24*, *CHEK1*, *ACRV1*, *HYLS1*, *SRPR*, *TIRAP*, *KIRREL3*, *ETS1*, *FLI1*,

KCNJ1, KCNJ5, BARX2, NFRKB, APLP2, ST14, ADAMTS8, NTM, OPCML, SPATA19, JAM3, VPS26B, ACAD8, B3GAT1, SIAE, SPA17, VSIG2, ESAM, C11orf61, CCDC15, SLC37A2, TMEM218, STT3A, PATE1, PATE2, PATE3, PATE4, PUS3, DDX25, CDON, RPUSD4, FAM118B, FOXRED1, DCPS, FLJ39051, ST3GAL4, MIR3167, C11orf45, TP53AIP1, ARHGAP32, TMEM45B, PRDM10, NCRNA00167, ZBTB44, ADAMTS15, SNX19, LOC283174, IGSF9B, LOC100128239, NCAPD3, THYN1, GLB1L3, GLB1L2 e LOC283177 (Figura 17).

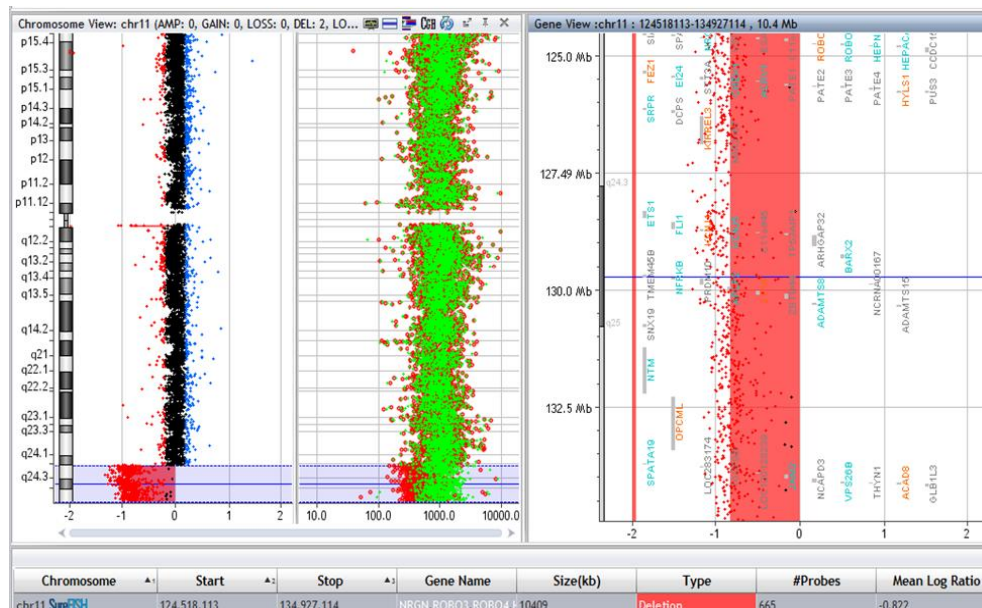


Figura 17 – Resultado do array-CGH no caso 7, demonstrando a deleção na região 11q24.2-qter e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER estão descritos bastantes casos de deleções nesta região, estando associadas a fenótipos como dismorfias faciais (características faciais grosseiras, orelhas proeminentes, bossa frontal, olhos profundos), atraso mental, anomalias na aorta e no coração, defeitos no septo atrial e ventricular, baixa estatura, atraso no crescimento intra-uterino, correspondendo às características apresentadas pela paciente deste caso, tal como na alteração anteriormente descrita.

As deleções na região 11qter são conhecidas como síndrome de Jacobsen, que está associada a anomalias craniofaciais, baixa estatura, anomalias congénitas do coração e atraso mental. Os genes da região deletada que estão possivelmente ligados ao atraso mental destes indivíduos são o *NRGN* (*neurogranin*) (OMIM *602350) e o *KIRREL3* (*Kin of Irre-Like 3*) (OMIM *607761). O *NRGN* é um gene envolvido na neuroplasticidade e funciona como alvo para a hormona da tiroide no cérebro⁹⁹. O gene *KIRREL3* codifica uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas, associada ao desenvolvimento do cérebro e à plasticidade sináptica¹⁰⁰.

Nesta paciente, não foi possível a validação das alterações e o estudo dos progenitores por qPCR. Contudo, com base em informações e dados provenientes da literatura, é possível concluir que estas alterações são patogénicas e responsáveis pelas características fenotípicas manifestadas por esta paciente.

Por outro lado, tendo em conta as alterações apresentadas pela paciente, uma deleção e uma duplicação, ambas nas regiões terminais dos cromossomas, este facto sugere tratar-se de um cromossoma derivativo resultante de uma translocação equilibrada entre os cromossoma 8p e 11q de um dos progenitores (Figura 18). No sentido de permitir um aconselhamento genético mais adequado a esta família foi sugerido a realização de cariótipo aos progenitores, com o objetivo de avaliar se a alteração encontrada é *de novo* ou herdada. É de salientar o facto que foi sugerida a realização de cariótipo porque pelo menos uma das alterações (deleção 11q) tinha um tamanho superior a 10 Mb que será visível pela resolução do cariótipo e pelo facto de que se procurar uma translocação equilibrada num dos progenitores, alteração esta que não seria detetada pela técnica de *array*.

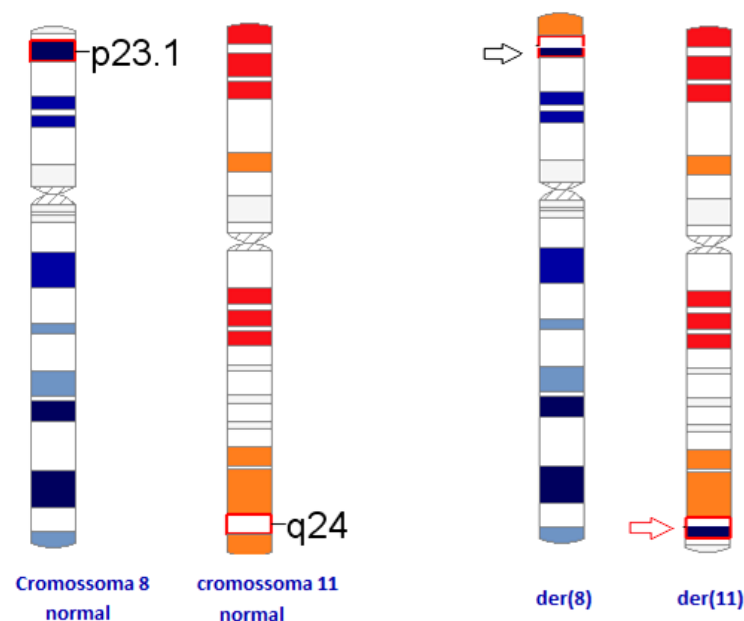


Figura 18 - Esquema representativo da translocação entre o cromossoma 8 e o cromossoma 11. Do lado esquerdo apresentam-se os ideogramas dos cromossomas normais e do lado direito os ideogramas dos cromossomas derivativos; no presente caso (caso 7) o resultado obtido pela técnica de *array* sugere que a paciente é portadora de uma segregação desequilibrada resultante de uma translocação equilibrada entre os cromossomas 8 e 11, ou seja, deverá ter um cariótipo 46, XX,der(11)t(8;11)(p23.1;q24). A presença do derivativo 11 traduz-se em trissomia parcial 11 e deleção parcial do 11q (seta vermelha).

Caso 8

Trata-se de uma paciente com 14 anos que apresenta défice cognitivo e escoliose. Nesta paciente foi detetada uma alteração patogénica (I) que se traduz

numa deleção da região 22q11.21, com 2569 kb e que afeta os genes *DGCR6*, *PRODH*, *DGCR2*, *TSSK2*, *SLC25A1*, *CLTCL1*, *HIRA*, *UFD1L*, *CLDN5*, *SEPT5*, *GP1BB*, *TBX1*, *GNB1L*, *TXNRD2*, *COMT*, *ARVCF*, *DGCR8*, *TRMT2A*, *ZDHHC8*, *RTN4R*, *DGCR6L*, *RIMBP3*, *ZNF74*, *PI4KA*, *SERPIND1*, *SNAP29*, *CRKL*, *LZTR1*, *SLC7A4*, *BCRP2*, *DGCR5*, *DGCR9*, *DGCR10*, *DGCR11*, *DGCR14*, *GSC2*, *MRPL40*, *C22orf39*, *CDC45*, *LOC150185*, *SEPT5GP1BB*, *C22orf29*, *C22orf25*, *MIR185*, *MIR3618*, *MIR1306*, *RANBP1*, *LOC150197*, *MIR1286*, *PI4KAP1*, *SCARF2*, *KLHL22*, *MED15*, *POM121L4P*, *TMEM191A*, *AIFM3*, *THAP7*, *FLJ39582*, *MGC16703*, *P2RX6*, *P2RX6P* e *LOC400891* (Figura 19).

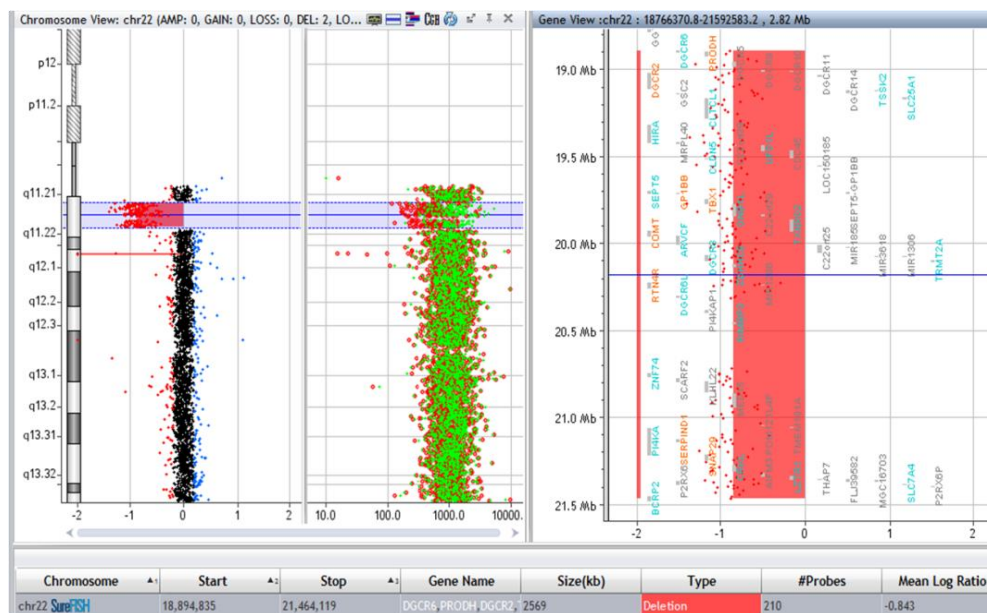


Figura 19 – Resultado do array-CGH no caso 8, demonstrando a deleção na região 22q11.21 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

A região 22q11 é caracterizada pela presença de *chromosome-specific low-copy-repeats* ou duplicações segmentais, o que leva a uma grande instabilidade e suscetibilidade de ocorrência de mutações. A deleção da região 22q11.2 está associada ao Síndrome de DiGeorge ou ao Síndrome Velocardiofacial. Consiste na microdeleção mais comum nos humanos, incluindo uma grande variedade de fenótipos clínicos, como anomalias congénitas do coração, atraso do desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem, malformações do esqueleto, anomalias psiquiátricas, entre outros. As deleções desta região resultam na perda de um segmento habitualmente entre 1.5-3 Mb¹⁰¹.

Na DGV estão descritas algumas CNVs nesta região, mas todas com uma extensão muito menor e nenhuma que se assemelhe em tamanho com a deleção encontrada. No DECIPHER, estão descritos inúmeros casos de deleções desta região com fenótipos variados, que incluem atraso mental, escoliose, autismo, anomalias de

alguns órgãos, como coração e rins, défice cognitivo, défice de atenção, anomalias faciais, entre outros.

Esta deleção engloba um grande número de genes, muitos dos quais ainda não estão bem caracterizados, mas sabe-se que a haploinsuficiência de alguns destes genes é responsável pela manifestação do fenótipo observado nas síndromes de DiGeorge ou Velocardiofacial. No entanto, ainda não foi estabelecida uma correlação entre o tamanho da deleção e o fenótipo observado¹⁰¹⁻¹⁰³. O gene *TBX1* (*T-box 1*) (OMIM *602054), que pertence a uma família de fatores de transcrição, tem sido considerado como o responsável pelas anomalias cardiovasculares e craniofaciais presentes nos indivíduos que apresentam estas deleções¹⁰⁴. Neste caso, a informação clínica disponível era escassa, não sendo possível saber se a doente apresentava ou não alguma anomalia facial ou problema cardiovascular. Os genes *PRODH* (*proline dehydrogenase*) (OMIM *606810) e *COMT* (*catechol-o-methyl-transferase*) (OMIM *116790) têm sido associados às alterações cognitivas presentes nos pacientes portadores desta deleção. O gene *PRODH* codifica uma enzima que degrada a prolina e é expresso no fígado, rins e cérebro. A haploinsuficiência deste gene e a consequente deficiência da enzima causam hiperprolinemia, que está associada ao atraso mental e doenças psiquiátricas. O gene *COMT* codifica uma enzima que degrada a dopamina no córtex pré-frontal. Estes dois genes demonstram uma interação e é sugerido que a sua haploinsuficiência está envolvida nos fenótipos cognitivos e psiquiátricos¹⁰⁵. No entanto, a base genética da grande variabilidade e penetrância dos sintomas desta síndrome ainda não foi estabelecida¹⁰⁴.

Neste caso não foi possível a realização do qPCR para determinar a origem desta deleção. Mas, tendo em conta as evidências presentes na bibliografia e os casos já reportados, é possível concluir que se trata de uma alteração patogénica e responsável pelo fenótipo apresentado por esta paciente.

Neste caso foram ainda reportadas duas alterações classificadas como IIIA. Uma deleção na região 1p36.22 de 51 kb que afeta o gene *NPPB* e uma deleção na região 5q13.2 que envolve os genes *OCN*, *SERF1A*, *SMN1*, *SMN2*, *NAIP*, *GTF2H2C*, *GTF2H2D*, *LOC100272216*, *GUSBP3*, *SERF1B*, *LOC100170939*, *GTF2H2B*, *SMA5* e *LOC100049076*.

Quanto à alteração no cromossoma 1, esta alteração não está presente na DGV e no DECIPHER estão reportados alguns casos de deleções da mesma região, mas com extensões muito maiores em comparação com a da paciente em causa. O gene *NPPB* (*natriuretic peptide B*) (OMIM *600295) está presente no OMIM e codifica

uma proteína que funciona como hormona cardíaca, no entanto, não existem dados bibliográficos que permitem relacionar este gene com o fenótipo da paciente.

Quanto à alteração encontrada no cromossoma 5, apesar da dimensão da deleção (aproximadamente 1,5 Mb) sugerida no perfil do *array*, apenas foram observados desvios em 3 sondas. Assim deve ser considerada a possibilidade de o intervalo da deleção ser de menor tamanho (68,849,594-68,849,653 e 70,309,796-70,369,959) e incluir apenas os genes *OCN*, *NAIP* e *GTF2H2*. Estes três genes estão descritos no OMIM e segundo informações desta base de dados, o *OCN* (*occludin*) (OMIM *602876) codifica uma proteína membrana das junções de oclusão e está associado a uma patologia denominada Calcificação Bilateral em bandas com polimicrogria, o *NAIP* (*NLR family, apoptosis inhibitory protein*) (OMIM *600355) já foi relacionado com a atrofia muscular espinhal e o *GTF2H2* (*general transcription factor IIH, polypeptide 2*) (OMIM *601748) codifica uma fator de transcrição envolvido na reparação do DNA e pode também estar associado à atrofia muscular espinhal. No entanto, também não é claro se esta alteração está relacionada com o fenótipo manifestado pela paciente em causa.

Caso 9

Neste caso é apresentado um paciente de 23 anos que apresenta hábito marfanoíde (membros compridos e articulações laxas) com debilidade mental. Neste paciente foi encontrada uma trissomia do cromossoma 8 (Figura 20). Para confirmação desta trissomia, foi realizado o cariótipo de linfócitos com bandas de alta resolução. Para isso, foi realizada a cultura sincronizada de linfócitos provenientes de sangue periférico do paciente. O cariótipo teve o resultado de 47,XY+8[4]/46,XY[26], demonstrando que o paciente possui uma trissomia em mosaico do cromossoma 8 (Figura 21).

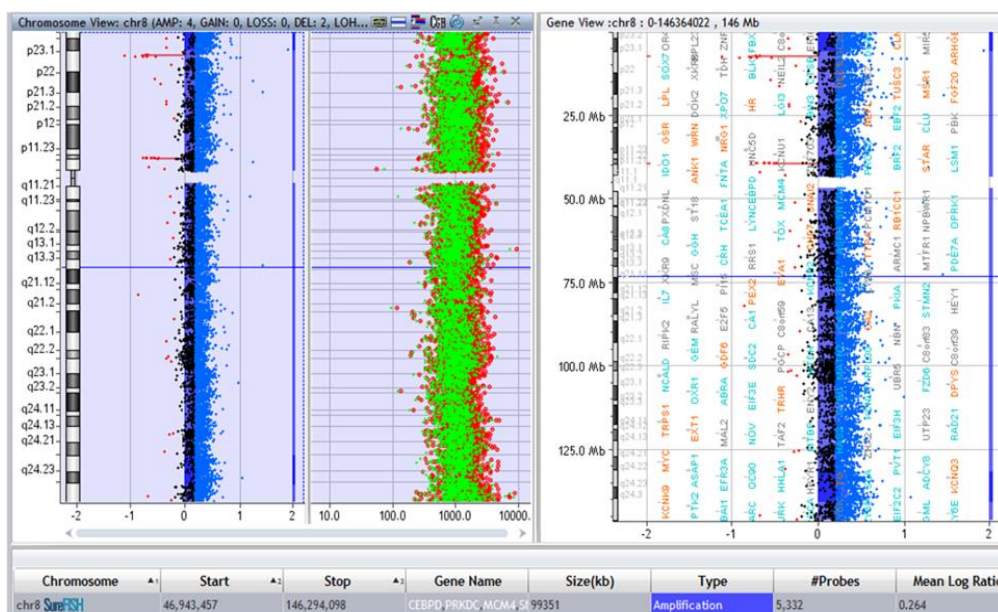


Figura 20 – Resultado do array-CGH no caso 9, demonstrando a duplicação de todo o cromossoma 8.

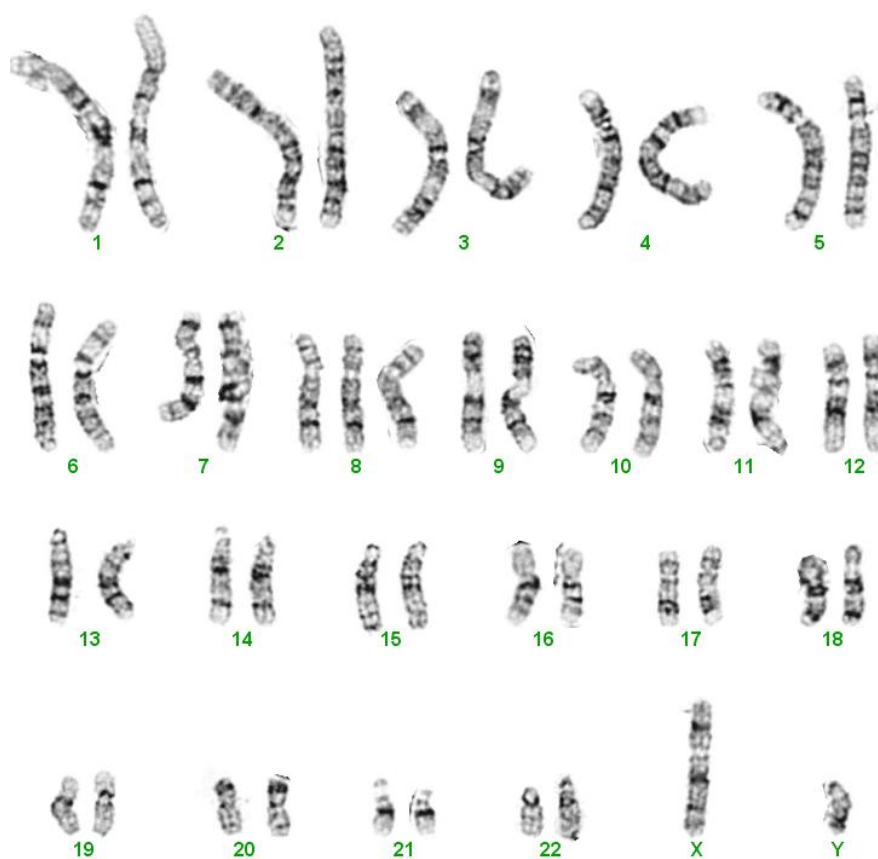


Figura 21 – Cariótipo de linfócitos com padrão de bandas de alta resolução realizado no caso 9, para confirmação da trissomia do cromossoma 8. O resultado do cariótipo (47,XY+8[4]/46,XY[26]) demonstrou ser um caso de trissomia em mosaico. A imagem apresentada corresponde aos cromossomas de uma célula onde está presente a trissomia do cromossoma 8.

A trissomia em mosaico do cromossoma 8 é uma anomalia cromossómica conhecida há vários anos, com uma incidência de 1:35000 em recém-nascidos, sendo mais frequente no sexo masculino. Esta trissomia provoca fenótipos extremamente variáveis, tais como anomalias no sistema nervoso central, oculares, renais e cardíacas, atraso mental, dismorfias faciais, contraturas articulares, displasia esquelética. É também uma das alterações cromossómicas mais frequentes em doenças cancerígenas, como a leucemia. O grau de mosaicismo não está associado à gravidade do fenótipo provocado¹⁰⁶⁻¹¹⁰.

Não há indicações da presença de hábito marfanoíde em indivíduos com trissomia em mosaico do cromossoma 8, no entanto, este fenótipo presente neste paciente pode estar relacionado com as anomalias esqueléticas causadas por esta anomalia cromossómica. O atraso mental presente no paciente também deverá ser consequência da presença da trissomia. Assim, conclui-se que esta é uma alteração patológica e responsável pelo fenótipo do paciente.

Neste paciente foi encontrada ainda uma deleção classificada como IIIA, na região Xp22.2, com 463 kb e que afeta os primeiros 7 exões do gene *GLRA2*. Esta alteração não está descrita na DGV e no DECIPHER estão descritas deleções da mesma região, mas, na sua maioria, são muito mais extensas do que a encontrada neste paciente. O gene *GLRA2* (*glycine receptor, alpha 2*) (OMIM *305990) é conhecido por codificar a subunidade *alpha-2* do recetor da glicina e por ser expresso no cérebro e na medula espinhal dos fetos, enquanto a subunidade *alpha-1*, codificada pelo gene *GLRA1*, é expressa no cérebro e medula espinhal dos adultos¹¹¹. Este gene está envolvido no desenvolvimento do córtex cerebral, através do controlo dos interneurónios corticais¹¹². Tendo em conta a função deste gene, é importante não excluir um possível papel desta deleção no fenótipo de debilidade mental apresentado por este paciente.

Caso 10

Descreve-se um paciente de 42 anos de idade que foi referenciado para estudo genético devido à presença de défice cognitivo, fâcies dismórfica e pescoço longo. Neste caso através de *array-CGH* detetaram-se duas alterações patogénicas (I).

A primeira alteração encontrada foi uma deleção na região 1q21.1q21.2 de 3560 kb e que envolve os genes *GPR89A*, *FMO5*, *CHD1L*, *BCL9*, *GJA5*, *GJA8*, *GPR89B*, *NBPF15*, *FCGR1C*, *GPR89C*, *PDZK1P1*, *NBPF11*, *NBPF24*, *LOC728989*, *PRKAB2*, *PDIA3P*, *ACP6*, *FLJ39739*, *PPIAL4B*, *PPIAL4A*, *NBPF14*, *PPIAL4D*, *PPIAL4F*, *NBPF16*, *PPIAL4E*, *LOC645166* e *LOC388692* (Figura 22).

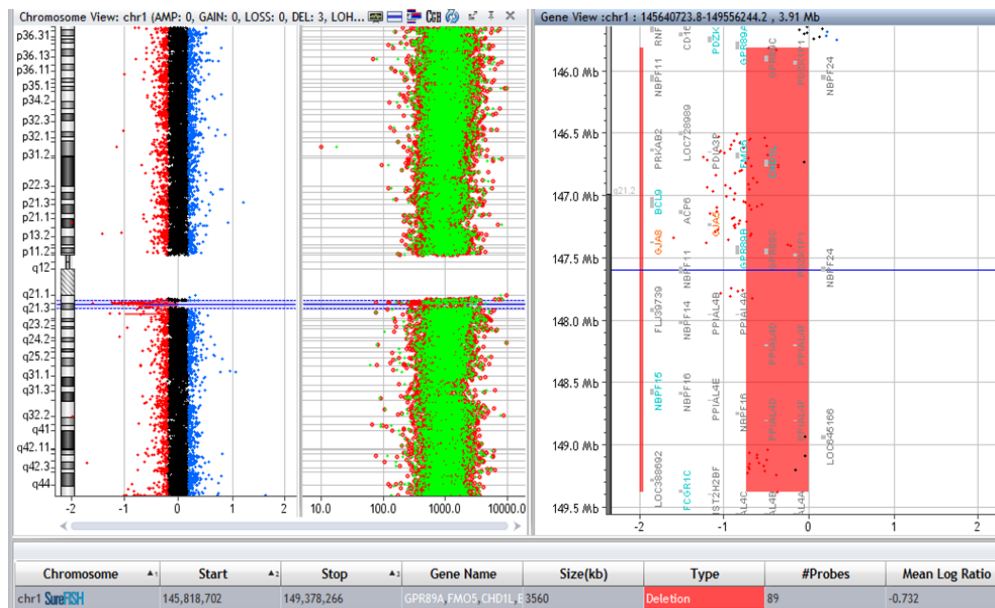


Figura 22 – Resultado do array-CGH no caso 10, demonstrando a deleção na região 1q21.1q21.2 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER estão descritos vários casos de deleções desta região, caracterizados por dismorfias faciais, atraso mental, atraso no desenvolvimento da linguagem, entre outros. No OMIM está descrita a síndrome de deleção 1q21.1 (OMIM #612474), que coincide com a região deletada do paciente. Em vários estudos, esta deleção já foi relacionada com o atraso mental, autismo ou anomalias congénitas¹¹³⁻¹¹⁵. Esta alteração está associada a uma grande diversidade de fenótipos e apresenta penetrância incompleta, não se verificando características sindrómicas distintas. Os fenótipos mais frequentes causados por esta deleção incluem atraso mental leve a moderado, dismorfias, microcefalia, podendo ser também observadas anomalias congénitas no coração, hipotonia e epilepsia. A deleção mínima desta região observada é de aproximadamente 1,35 Mb e inclui pelo menos 7 genes, não existindo diferenças fenotípicas acentuadas entre os portadores de deleções com pontos de quebra diferentes¹¹⁶. Dois dos genes que têm sido apontados como causadores dos fenótipos característicos desta síndrome são o *CHD1L* (*chromodomain helicase DNA binding protein 1-like*) (OMIM *613039) e o *PRKAB2* (*protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit*) (*602741). O *CHD1L* está envolvido na remodelação da cromatina, nos mecanismos de resposta a danos do DNA e por regular indiretamente processos biológicos, como replicação, transcrição e translação. O *PRKAB2* codifica uma subunidade de AMPK (*AMP-activated protein kinase*) que tem um papel regulatório na resposta celular a vários estímulos externos e mostra-se também importante em funções cerebrais, uma vez que foi demonstrado que esta proteína tem

a capacidade de inibir a via mTOR, necessária para os processos de memória e aprendizagem¹¹⁷.

A deleção observada no nosso paciente é mais extensa do que as que têm sido reportadas na literatura, envolvendo mais genes. Assim sendo, esta alteração deverá ser patogénica e terá influência no fenótipo do paciente, ou pelo menos, em parte dele.

A outra alteração patogénica encontrada foi uma deleção na região 16p11.2 com 546 kb que abrange os genes *SPN*, *QPRT*, *KIF22*, *MAZ*, *C16orf53*, *MVP*, *KCTD13*, *DOC2A*, *ALDOA*, *PPP4C*, *TBX6*, *YPEL3*, *MAPK3*, *C16orf54*, *ZG16*, *PRRT2*, *CDIPT*, *LOC440356*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *TMEM219*, *TAOK2*, *HIRIP3*, *INO80E*, *C16orf92*, *FAM57B*, *GDPD3*, *LOC100271831* e *CORO1A* (Figura 23).

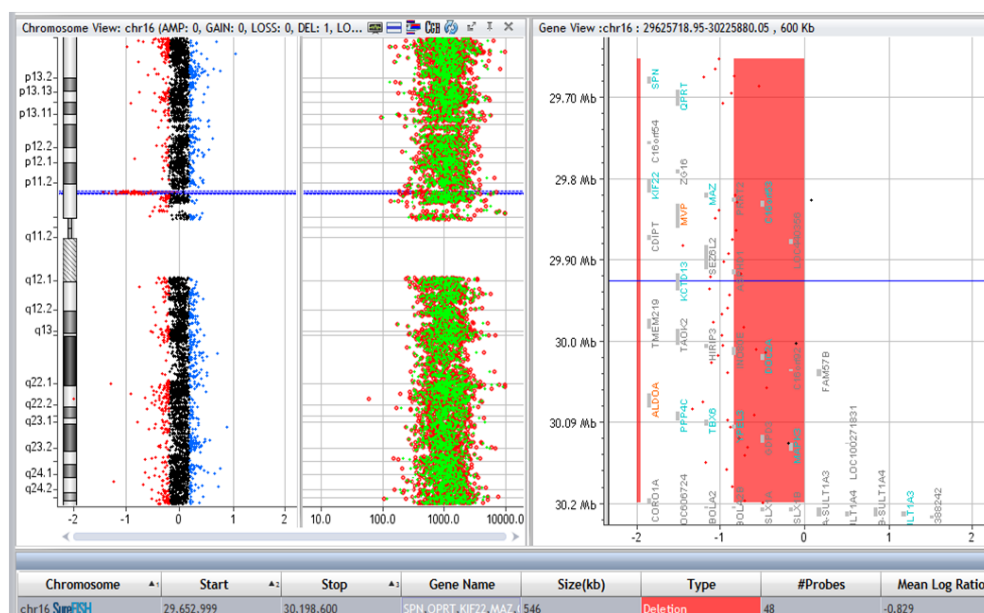


Figura 23 – Resultado do array-CGH no caso 10, demonstrando a deleção na região 16p11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER estão descritos casos com deleções da mesma região que se caracterizam por fenótipos variáveis, incluindo atraso mental, anomalias faciais e pescoço longo, coincidindo com as características deste paciente. No OMIM, está descrita a síndrome de deleção 16p11.2 (OMIM #611913), que coincide com a CNV encontrada no paciente. A alteração encontrada no paciente, assim como aquelas que caracterizam a síndrome de deleção 16p11.2, situa-se entre as coordenadas genómicas 29,652,999 e 30,198,600, localizando-se mais próxima da região centromérica do que uma outra deleção que dá origem à síndrome de deleção 16p11.2-p12.2. Esta síndrome localiza-se mais próxima da região telomérica e é caracterizada por atraso mental e por anomalias congénitas. Já a síndrome de deleção

16p11.2 é conhecida por estar associada a suscetibilidade para doenças do espectro autista, atraso de desenvolvimento, défice cognitivo e obesidade^{118; 119}.

Pelo facto do nosso paciente apresentar défice cognitivo (que foi associado à presença da outra CNV patogénica – deleção 1q21.1q21.2) e já ter 42 anos, o fenótipo associado a doenças do espectro autista poderá estar mascarado. Por outro lado, deverá ser considerada a possibilidade de um efeito aditivo desta CNV para o défice cognitivo.

Neste caso foi também encontrada uma alteração classificada como IIIA, uma deleção na região 7q11.22 de 27 kb que atinge parte do gene *AUTS2* (Figura 24). Esta alteração não está presente na DGV e é coincidente com algumas das deleções descritas no DECIPHER nesta região e que incluem fenótipos como atraso mental, atraso na linguagem e autismo. No OMIM, o gene *AUTS2* (*autism susceptibility candidate 2*) (OMIM *607270) está associado a atraso mental (OMIM #615834), devido a variações intragénicas do número de cópias deste gene. Apesar de estarem descritos vários casos de deleções exónicas deste gene associadas a atraso mental, autismo, alterações no neurodesenvolvimento e malformações congénitas^{120; 121}, a deleção encontrada no nosso paciente é de tamanho reduzido e afeta apenas o intrão 1 do gene. Deleções que afetam apenas este intrão já foram descritas no DECIPHER num paciente que apresentava dislexia, atraso na linguagem e dismorfias faciais e num estudo publicado em 2011, num paciente também com dislexia^{121; 122}.

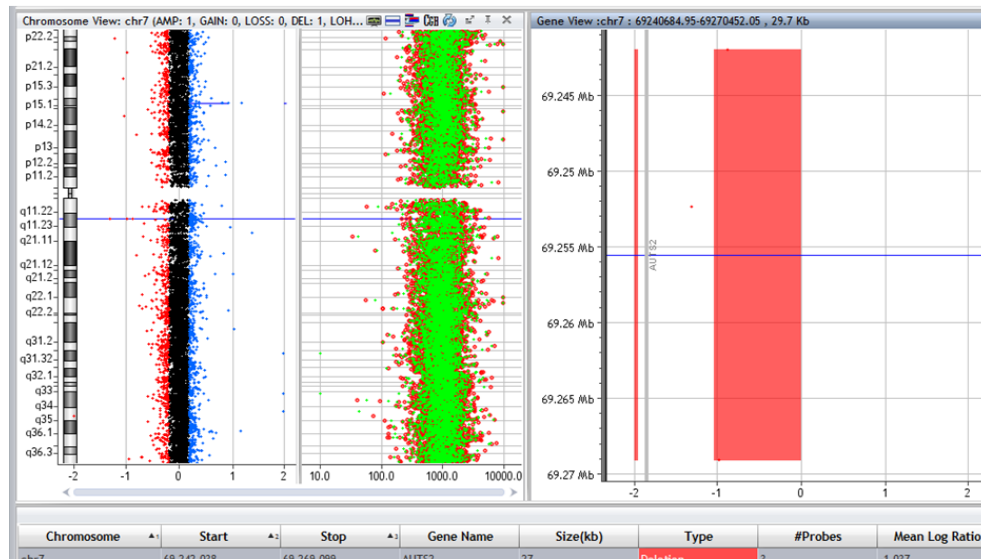


Figura 24 – Resultado do array-CGH no caso 10, demonstrando a deleção na região 7q11.22 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Devido à importância do gene afetado, foi realizada a técnica de qPCR que permitiu validar esta alteração, demonstrando a existência de apenas uma cópia do gene *AUTS2* (Figura 25).

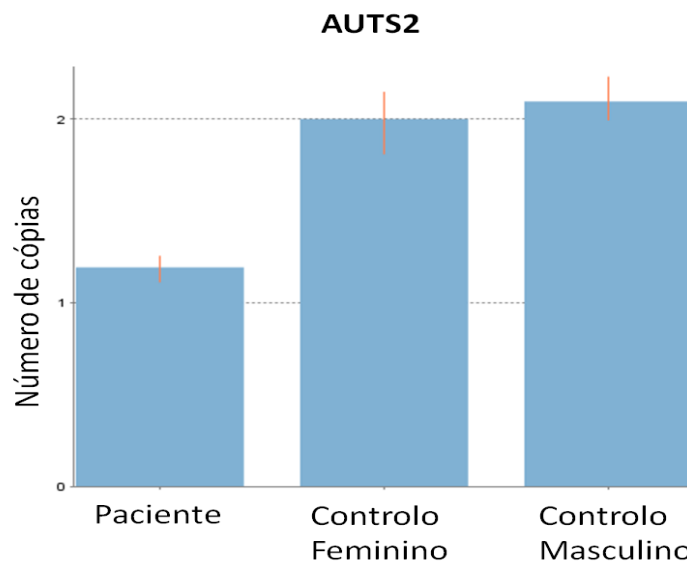


Figura 25 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do software CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *AUTS2* determinadas no paciente 10, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Por ser uma deleção intrónica, não se podem tirar conclusões claras sobre a sua patogenicidade. No entanto, como se localiza num gene relacionado com o atraso mental, não se pode excluir a hipótese desta deleção ter influência no padrão de expressão do gene, influenciando assim o fenótipo do paciente.

Assim, conclui-se que as alterações encontradas nos cromossomas 1 e 16 são patogénicas e responsáveis pelo fenótipo apresentado por este paciente. A alteração no cromossoma 7 é provavelmente patogénica, podendo estar envolvida nas manifestações clínicas descritas.

Caso 11

Esta paciente foi referenciada para estudo genético aos 10 anos de idade por apresentar défice cognitivo, com um QI de 69, e sindactilia dos 2º e 3º dedos dos pés. O array-CGH permitiu identificar uma alteração patogénica (I), que consiste numa deleção na citobanda 16p11.2, com 546 kb e que envolve os genes *SPN*, *QPRT*, *KIF22*, *MAZ*, *C16orf53*, *MVP*, *KCTD13*, *DOC2A*, *ALDOA*, *PPP4C*, *TBX6*, *YPEL3*, *MAPK3*, *C16orf54*, *ZG16*, *PRRT2*, *CDIPT*, *LOC440356*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *TMEM219*, *TAOK2*, *HIRIP3*, *INO80E*, *C16orf92*, *FAM57B*, *GDPD3*, *LOC100271831* e *CORO1A* (Figura 26).

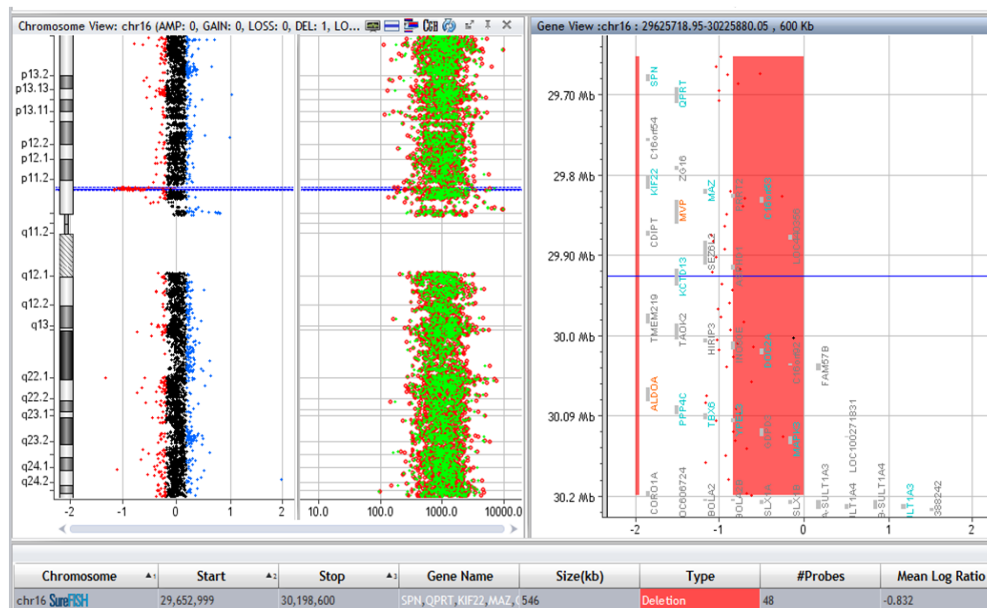


Figura 26 – Resultado do array-CGH no caso 11, demonstrando a deleção na região 16p11.2 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Esta alteração é idêntica à deleção encontrada no paciente do caso 10 que, à semelhança da paciente deste caso, apresenta também um défice cognitivo.

Para validar a alteração na paciente e para estudar a presença da mesma alteração nas suas irmãs, foi realizado um qPCR com uma sonda específica para o exão 10 do gene *ALDOA*. A alteração foi validada na paciente, apresentando apenas uma cópia do gene, enquanto as duas irmãs demonstraram possuir duas cópias do gene, não apresentando a mesma alteração (Figura 27). A presença de défice intelectual e anomalias congénitas associadas à presença desta CNV está de acordo com a literatura, pelo que foi atribuído um carácter patogénico, permitindo identificar a causa genética para as manifestações clínicas do doente.

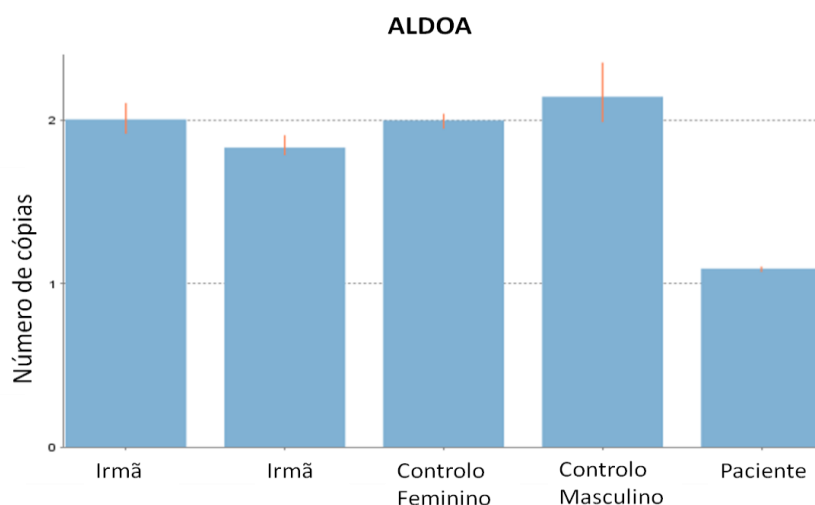


Figura 27 - Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do software CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *ALDOA* determinadas no paciente 11 e nas suas irmãs, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Nesta paciente foram ainda encontradas duas alterações classificadas como IIIA. Uma das alterações consiste numa deleção na região 12q15 com 25 kb que inclui o gene *LRRC10*. Esta alteração não está presente na DGV, mas aparece descrita apenas em quatro casos no DECIPHER que indicam atraso mental, atraso geral no desenvolvimento e algumas anomalias congénitas. O gene *LRRC10* (*Leucine-rich repeat containing 10*) (OMIM *610846) está associado ao desenvolvimento do coração, sendo que quando deletado pode provocar doenças cardíacas¹²³. No entanto, de acordo com a informação clínica disponível, a paciente em estudo não possui anomalias no coração, não sendo por isso possível chegar a conclusões sobre a patogenicidade desta alteração.

A outra alteração IIIA encontrada foi uma deleção na citobanda Xq27 com 411 kb que envolve os genes *SPANXA2*, *SPANXA1* e *CXorf18*. Esta alteração está descrita com baixa frequência na DGV e no DECIPHER estão presentes várias deleções coincidentes reportando atraso mental e no desenvolvimento, indicando também em alguns casos anomalias nos dedos, nomeadamente, dedos curtos, diminuição da falange média e clinodactilia. Os genes *SPANXA1* (*SPANX family, member A1*) (OMIM *300305) e *SPANXA2* (*SPANX family, member A2*) (OMIM *300493) pertencem à família de genes *SPANX* (*sperm protein associated with the nucleus in the X chromosome*), que tem sido associada a cancro da mama, do ovário, do testículo, melanomas, glioblastomas, entre outros¹²⁴. Tendo em conta o seu conteúdo génico, não é possível relacionar esta alteração com o fenótipo da paciente, no entanto, como estão descritos casos semelhantes no DECIPHER, não se pode excluir um possível papel patogénico desta deleção na paciente em causa.

Caso 12

Este caso trata-se de um paciente de 12 anos que apresenta défice cognitivo. O irmão deste paciente, de 7 anos, já tinha sido alvo de um estudo genético devido a atraso global de desenvolvimento, polifagia, obesidade difusa, estatura elevada e provável hipogonadismo. Este irmão possui uma deleção patogénica na região 16p11.2 de 546 kb que envolve os genes *SPN*, *QPRT*, *KIF22*, *MAZ*, *C16orf53*, *MVP*, *KCTD13*, *DOC2A*, *ALDOA*, *PPP4C*, *TBX6*, *YPEL3*, *MAPK3*, *C16orf54*, *ZG16*, *PRRT2*, *CDIPT*, *LOC440356*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *TMEM219*, *TAOK2*, *HIRIP3*, *INO80E*, *C16orf92*, *FAM57B*, *GDPD3*, *LOC100271831* e *CORO1A*. No paciente, foi encontrada uma deleção na mesma região, mas mais extensa, com 1065 kb e que envolve os genes *SULT1A3*, *SPN*, *QPRT*, *KIF22*, *MAZ*, *C16orf53*, *MVP*, *KCTD13*, *DOC2A*, *ALDOA*, *PPP4C*, *TBX6*, *YPEL3*, *MAPK3*, *RUNDC2C*, *LOC606724*, *BOLA2*, *BOLA2B*, *SLX1A*, *SLX1B*, *SLX1A-SLX1B*, *SULT1A4*, *SULT1A4*, *SULT1A3*, *LOC388242*,

LOC613038, LOC440354, SLC7A5P1, C16orf54, ZG16, PRRT2, CDIPT, LOC440356, SEZ6L2, ASPHD1, TMEM219, TAOK2, HIRIP3, INO80E, C16orf92, FAM57B, GDPD3, LOC100271831 e CORO1A (Figura 28).

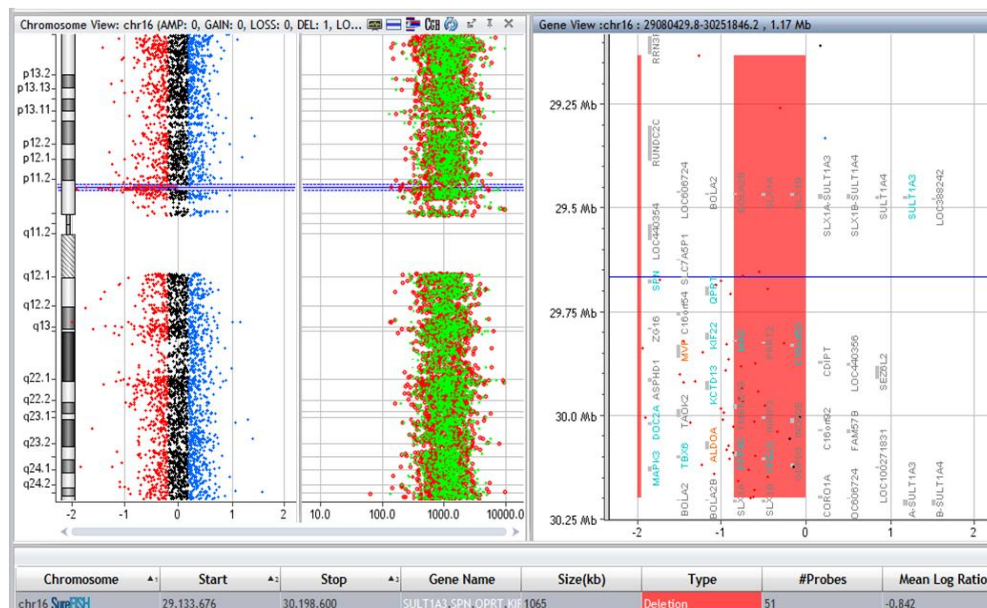


Figura 28 – Resultado do array-CGH no caso 12, demonstrando a deleção na região 16p11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

A alteração presente no irmão do paciente é a mesma que foi encontrada nos casos 10 e 11 e que se encontra numa região de suscetibilidade ao autismo. No entanto, a alteração encontrada no paciente em estudo neste caso é mais extensa e sobrepõe-se à região proposta por Battaglia *et al.* por estar envolvida na síndrome de microdeleção 16p11.2-p12.2 e por conter genes responsáveis por atraso mental e anomalias congénitas¹¹⁸. O facto de a região ser mais extensa pode explicar os fenótipos diferentes encontrados nos dois irmãos. Esta alteração está descrita em variados casos do DECIPHER, onde predominam os fenótipos de atraso mental, mas também de obesidade e atraso global do desenvolvimento, tal como observado no irmão do paciente.

Foi realizado o qPCR com uma sonda específica para o exão 10 do gene *ALDOA*, para validação da alteração e para estudo genético dos progenitores deste paciente. Os resultados permitem validar a alteração e observar que esta foi herdada da mãe que também apresenta uma cópia do gene, à semelhança do paciente, enquanto o pai apresenta duas cópias do gene (Figura 29).

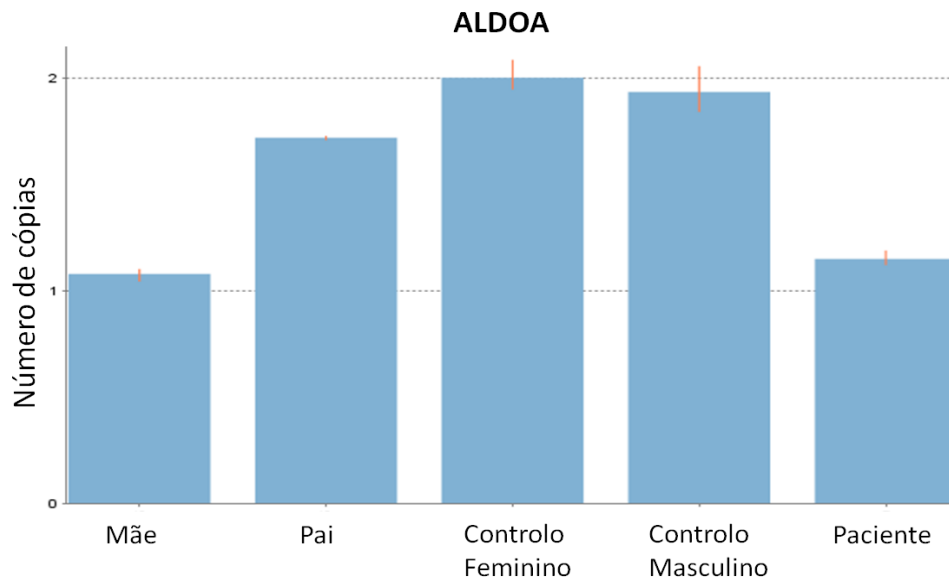


Figura 29 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *ALDOA* determinadas no paciente 12 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Neste caso é importante ter em conta que o irmão do paciente apresenta uma deleção na mesma região, que também inclui o gene *ALDOA*, mas com menor dimensão. O estudo pela técnica de qPCR apenas permitiu confirmar que a deleção do gene *ALDOA* foi herdada por via materna e que ambos os filhos a herdaram, não sendo possível com a análise de apenas este gene inferir acerca da extensão da deleção. Assim, para esta família, seria mais recomendado o estudo por *array*-CGH nos progenitores. O resultado obtido permitirá concluir se a mãe é portadora da deleção menos extensa (semelhante à do filho mais novo) que, depois de transmitida ao seu filho mais velho, sofreu uma expansão. A expansão de deleções é um evento raro, mas é uma hipótese que não pode ser excluída¹²⁵. Outra hipótese seria o pai ser portador de uma deleção com localização proximal mas mais telomérica à presente na mãe, não envolvendo o gene *ALDOA*, e que o filho mais velho tivesse herdado as duas deleções em simultâneo.

Neste paciente foram ainda encontradas quatro alterações classificadas como IIIA: uma deleção de 131 kb na região 6p21.32 que envolve os genes *HLA-DRA*, *HLA-DRB5* e *HLA-DRB6*; uma deleção de 36 kb na citobanda 9q22.32 atingindo o gene *C9orf3*; uma deleção na região 11q13.5 de 61 kb que afeta o gene *WNT11* e uma deleção na região 20p13 de 54 kb envolvendo o gene *ADRA1D*. Até ao momento, nenhum dos genes afetados por estas deleções parece estar relacionado com o défice cognitivo encontrado neste paciente. Estas alterações estão presentes com baixa frequência na DGV. No DECIPHER, estão descritas deleções nas mesmas regiões

que as encontradas nos cromossomas 6 e 9, que estão associadas a casos de atraso mental e atraso global do desenvolvimento, entre outros fenótipos.

Ainda assim, com a informação disponível, não é possível concluir com clareza acerca da patogenicidade destas alterações neste paciente.

Caso 13

Este caso refere-se a uma paciente do sexo feminino que apresenta défice cognitivo e cardiopatia congénita (estenose aórtica valvular) e que foi referenciada para estudo genético aos 12 anos. Nesta paciente foi encontrada uma duplicação patogénica (I) no cromossoma 17p11.2 com 3706 kb que envolve os genes *TNFRSF13B*, *MPRIIP*, *FLCN*, *COPS3*, *NT5M*, *MED9*, *RASD1*, *RAI1*, *SREBF1*, *ATPAF2*, *DRG2*, *MYO15A*, *LLGL1*, *FLII*, *TOP3A*, *SHMT1*, *FBXW10*, *PRPSAP2*, *EPN2*, *MAPK7*, *MFAP4*, *SLC47A1*, *ALDH3A2*, *SLC47A2*, *ALDH3A1*, *AKAP10*, *PLD6*, *PEMT*, *SMCR5*, *MIR33B*, *TOM1L2*, *LRRC48*, *C17orf39*, *ALKBH5*, *SMCR7*, *SMCR8*, *EVPLL*, *LOC339240*, *LGALS9C*, *LOC220594*, *FAM106A*, *CCDC144B*, *TBC1D28*, *ZNF286B*, *FOXO3B*, *TRIM16L*, *FAM18B1*, *SLC5A10*, *FAM83G*, *GRAP*, *GRAPL*, *B9D1*, *MIR1180*, *RNF112*, *SNORA59B*, *SNORA59A*, *ULK2*, *SPECC1*, *CCDC144C*, *LGALS9B* e *KRT16P3* (Figura 30).

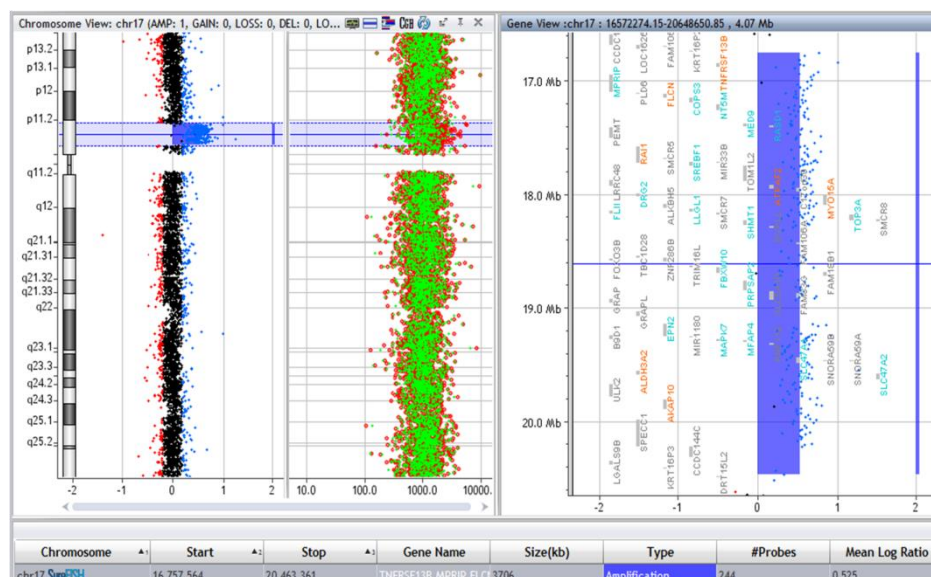


Figura 30 – Resultado do array-CGH no caso 13, demonstrando a duplicação na região 17p11.2 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

A duplicação encontrada nesta paciente coincide com a Síndrome de Potocki-Lupski (OMIM #610883). Estas duplicações ocorrem por NAHR, pois a região é flanqueada por *region-specific low-copy repeats* (LCRs), entre os quais ocorre *crossing-over* desigual durante a meiose, fazendo com que seja bastante propícia a deleções e duplicações¹²⁶. As alterações características desta síndrome incluem

atraso no desenvolvimento e crescimento, atraso mental desde leve a severo, hipotonia, anomalias cardiovasculares e distúrbios do comportamento, tais como autismo, ansiedade e défice de atenção¹²⁷⁻¹³².

O gene que é sugerido como maior responsável pelos fenótipos causados por esta síndrome é o *RAI1* (*retinoic acid induced 1*) (OMIM *607642), que é expresso em altos níveis no sistema nervoso. O *RAI1* é o maior contribuinte para o fenótipo característico da deleção recíproca, a Síndrome de Smith-Magenis, e por ser sensível à dosagem, pensa-se que a sua duplicação é igualmente patogénica, levando a consequências neurocomportamentais e craniofaciais^{129; 132}. Para além disso, já foram reportados casos de duplicações muito menos extensas em que estavam presentes as alterações características da Síndrome de Potocki-Lupski. O *RAI1* é o único gene comum a todas as duplicações já encontradas em indivíduos que sofrem desta síndrome¹³³. Estudos em ratos com trissomia deste gene, mostraram que nos casos em que a dissomia foi reposta, as características físicas e comportamentais associadas à duplicação foram revertidas¹³⁴.

O défice cognitivo e a cardiopatia congénita que se observam na paciente em estudo coincidem com os fenótipos característicos da Síndrome de Potocki-Lupski, permitindo concluir que esta alteração é a responsável pelas patologias presentes. Neste caso não foi possível a realização do qPCR para validação e para estudo dos progenitores.

Nesta paciente foi ainda encontrada uma deleção classificada como IIIA, na região 16p11.2 com 1154 kb e que envolve os genes *TP53TG3B*, *TP53TG3*, *SLC6A10P*, *LOC653550* e *LOC390705*. Esta é uma região propícia a deleções patogénicas, como se observa nos pacientes 10, 11 e 12, no entanto, nesta paciente, a deleção situa-se numa zona menos rica em genes. Esta deleção está presente na DGV com baixa frequência e em apenas 5 casos do DECIPHER, onde se observam fenótipos de alterações no comportamento, atraso no desenvolvimento, défice de atenção, atraso mental e algumas dismorfias. Nenhum dos genes afetados pela deleção se encontra presente na base de dados do OMIM. O gene *SLC6A10P* é um pseudogene originário do *SLC6A8* que apresenta expressão nos testículos e no cérebro, mas a sua função ainda não foi revelada. No entanto, o *SLC6A8* codifica um transportador de creatina, cuja deficiência foi já associada a atraso mental¹³⁵.

Assim sendo, no caso particular deste intervalo genómico não é possível concluir acerca da patogenicidade desta deleção, pelo que se classificou como CNV de significado clínico desconhecido.

Caso 14

O caso 14 refere-se a uma paciente de 10 anos que apresenta défice cognitivo, macrocefalia e dismorfias *minor*. Nesta paciente foi encontrada uma alteração patogénica (I) que consiste numa deleção da região 7q11.23 de 1053 kb que envolve os genes *HIP1*, *CCL26*, *CCL24*, *POR*, *MDH2*, *HSPB1*, *YWHAG*, *SRCRB4D*, *ZP3*, *UPK3B*, *RHBDD2*, *SNORA14A*, *TMEM120A*, *STYXL1*, *SRRM3*, *DTX2*, *FDPSL2A* e *LOC100133091* (Figura 31). No caso 15, foi também encontrada uma alteração da mesma região, mas trata-se de uma duplicação e é mais extensa que a deleção deste caso.

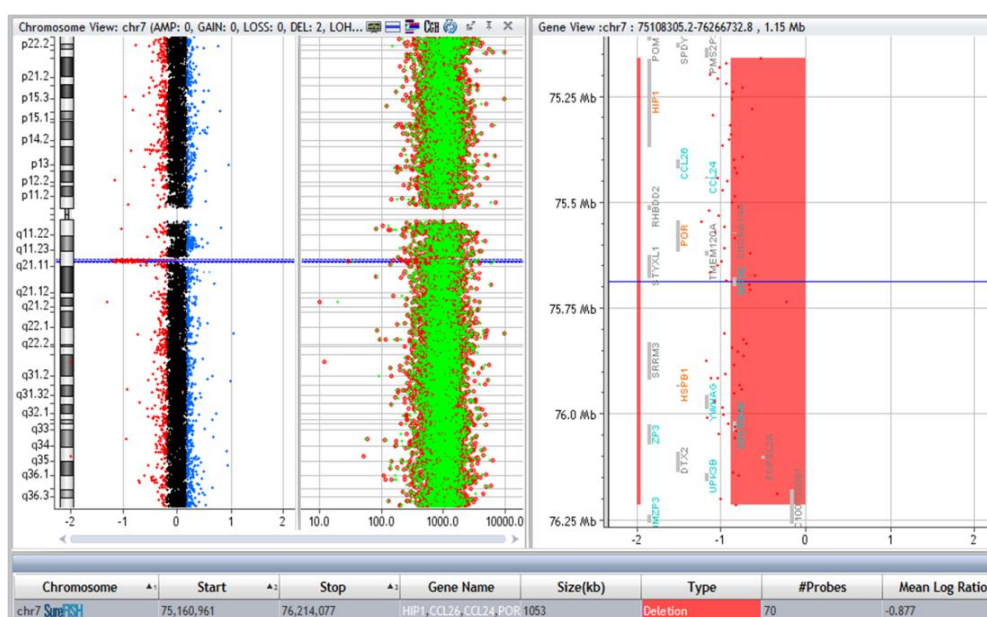


Figura 31 – Resultado do array-CGH no caso 14, demonstrando a deleção na região 7q11.23 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

A deleção desta região é associada à Síndrome de Williams-Beuren (OMIM #194050). No caso desta paciente, a deleção é mais pequena do que as deleções típicas desta síndrome, mas o seu papel patogénico tem de ser tido em conta. No DECIPHER, deleções nesta região mesmo com menor extensão estão também associadas a atraso mental e anomalias faciais.

Alguns genes presentes nesta região, foram já associados às alterações desta síndrome. Quando deletado, o gene *HIP1* (*huntingtin interacting protein 1*) (OMIM *601767) provoca atraso mental, epilepsia, atraso no crescimento e outros problemas neurocomportamentais¹³⁶. Um outro gene que foi também já relacionado ao atraso cognitivo presente na Síndrome de Williams-Beuren é o *HSP27* (*heat shock 27kDa protein 1*) (OMIM *602195)¹³⁷. Mutações missense no gene *STYXL1* (*serine/threonine/tyrosine interacting-like 1*) estão associadas a atraso mental, acompanhado de epilepsia e distúrbios comportamentais¹³⁸. O gene *GTF2IRD1*

(*GTF2I repeat domain containing 1*) (OMIM *604318), já foi associado a funções cognitivas e às manifestações neurológicas presentes nos indivíduos com Síndrome de Williams-Beuren¹³⁹. A deleção destes genes pode, assim, explicar o fenótipo desta paciente.

Nesta paciente, foram ainda encontradas mais três alterações classificadas como IIIA. Uma das alterações corresponde a uma deleção da região 7p14.1 de 98 kb que inclui o gene *TARP*. A outra alteração consiste numa duplicação da região 16p11.2 de 1331 kb que envolve os genes *MIR1826*, *UBE2MP1* e *LOC283914*. Por fim, a última alteração encontrada foi uma deleção na região 17q12 de 76 kb e que abrange os genes *SLFN11*, *SLFN12* e *SLFN13*.

Quanto à deleção no cromossoma 7, esta alteração está descrita na DGV, mas também coincide com deleções da mesma região em alguns casos do DECIPHER, que apresentam anomalias faciais, do coração, macrocefalia, atraso global do desenvolvimento, atraso mental e dificuldades de aprendizagem. O gene *TARP* (*TCR gamma alternate reading frame protein*) (OMIM *609642) é regulado positivamente pelo androgénio nas mitocôndrias de linhas celulares prostáticas, localizando-se nas membranas externas destes organelos¹⁴⁰. No entanto, sendo esta paciente do sexo feminino e apesar dos casos descritos no DECIPHER, através dos dados encontrados não é possível concluir com clareza acerca da patogenicidade desta alteração e da deleção de parte deste gene.

Quando à duplicação no cromossoma 16, já tinham sido encontradas deleções nesta região nos casos 10, 11, 12 e 13, mas nesta paciente, a alteração encontrada, para além de se tratar de uma duplicação, localiza-se noutra posição genómica da região do cromossoma 16p11.2. Esta alteração encontra-se presente na DGV mas também coincide com algumas das duplicações da mesma região descritas no DECIPHER, que estão associadas a autismo, atraso mental, macrocefalia, atraso no desenvolvimento e na linguagem, entre outros. Esta alteração foi classificada como IIIA porque apesar de ser uma região propícia a patogenicidade, nenhum dos genes presentes na região duplicada está descrito na base de dados do OMIM e existem alguns casos descritos na DGV de indivíduos normais portadores deste tipo de CNV.

Por último e no que diz respeito à deleção encontrada no cromossoma 17, é uma alteração que se encontra presente com pouca frequência na DGV e descrita algumas vezes no DECIPHER, no entanto, os fenótipos não são coincidentes. Os genes *SLFN11* (OMIM *614953), *SLFN12* (OMIM *614955) e *SLFN13* (OMIM *614957) estão descritos no OMIM e pertencem a uma família de genes que está envolvida na regulação do crescimento celular e no desenvolvimento das células T¹⁴¹. Tal como as

outras alterações classificadas como IIIA, não é possível concluir acerca da sua patogenicidade, uma vez que não parecem existir evidências que relacionem estas alterações e os genes por estas afetados ao fenótipo apresentado pela paciente em estudo.

Caso 15

Este caso reporta uma paciente de 11 anos com défice cognitivo, estrabismo e insensibilidade à dor. Nesta paciente foi encontrada uma alteração considerada patogénica (I) que consiste numa duplicação da região 7q11.23, com 2124 kb e que envolve os genes *GTF2I*, *NCF1*, *TRIM74*, *TRIM73*, *HIP1*, *CCL26*, *CCL24*, *POR*, *MDH2*, *HSPB1*, *YWHAG*, *SRCRB4D*, *ZP3*, *UPK3B*, *GTF2IRD2*, *STAG3L2*, *PMS2P5*, *GATSL1*, *WBSCR16*, *GTF2IRD2B*, *NCF1C*, *LOC100093631*, *GTF2IP1*, *GATSL2*, *SPDYE8P*, *PMS2L2*, *STAG3L1*, *NSUN5P1*, *POM121C*, *SPDYE5*, *PMS2P3*, *RHBDD2*, *SNORA14A*, *TMEM120A*, *STYXL1*, *SRRM3*, *DTX2*, *FDPSL2A* e *LOC100133091* (Figura 32).

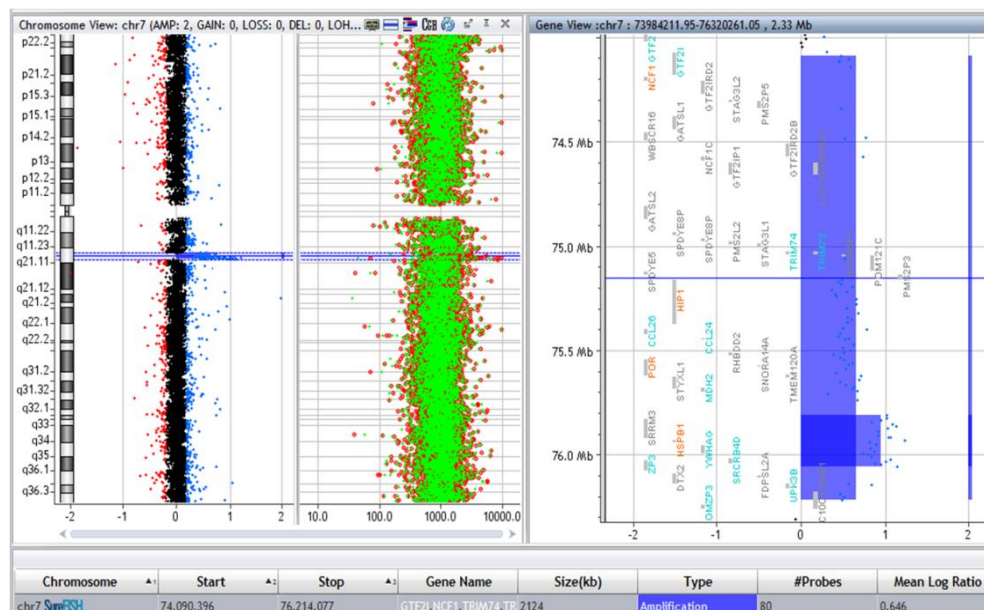


Figura 32 – Resultado do array-CGH no caso 15, demonstrando a duplicação na região 7q11.23 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Esta alteração não está descrita na DGV e está presente em alguns casos do DECIPHER, que referem sintomas como atraso mental, atraso no desenvolvimento da linguagem, autismo e estrabismo, coincidindo com as manifestações da paciente em estudo. No DECIPHER e no OMIM está ainda descrita a síndrome de duplicação 7q11.23 (OMIM #609757), que corresponde à região sobreponível à região deletada na Síndrome de Williams-Beuren.

Esta região está sujeita a NAHR e por isso é suscetível a variações no número de cópias¹⁴². A síndrome de duplicação desta região é caracterizada por múltiplos distúrbios do desenvolvimento e com manifestações variáveis, que incluem atraso no desenvolvimento da linguagem, anomalias craniofaciais, distúrbios cognitivos, que podem variar desde atraso mental a autismo, anomalias congénitas, como por exemplo, deficiências cardíacas, hérnias e criptorquidismo¹⁴³.

O gene *GTF21* (*general transcription factor IIIi*) já foi associado à ansiedade de separação, uma vez que em estudos de ratinhos, aqueles com cópias adicionais deste gene demonstravam maior ansiedade quando separados da progenitora¹⁴⁴. Foi também relacionado com comportamentos autistas e problemas de interação social, sugerindo um papel deste gene nos distúrbios comportamentais presentes nestas duplicações¹⁴⁵. Este gene pertence a uma família de genes que são expressos no cérebro, da qual faz também parte o *GTF2IRD1*, que, tal como referido no caso anterior, já foi associado a funções cognitivas e às manifestações neurológicas presentes nos indivíduos com Síndrome de Williams-Beuren¹³⁹, podendo apresentar também consequências quando presente em duplicações. Os genes *HIP1*, *HSP27* e *STYXL1* também estão associados aos fenótipos causados pela Síndrome de Williams-Beuren.

A deleção desta região está melhor estudada do que a duplicação e vários genes já foram associados aos fenótipos frequentes da Síndrome de Williams-Beuren, como já foi referido no caso 14. Apesar da síndrome de duplicação ser menos conhecida e o padrão de variabilidade fenotípica ser mais variável, a presença desta CNV justifica o fenótipo da paciente e, por isso, foi considerada patogénica. Apesar de não ter sido possível relacionar a presença de insensibilidade à dor demonstrada pela paciente com um gene em particular, a manifestação poderá resultar das alterações neurológicas que são típicas desta síndrome.

Nesta paciente foram também detetadas outras duas alterações que foram classificadas como IIIA. Uma delas consiste numa deleção da região 4q31.3 de 275 kb, que afeta o gene *LRBA*. A outra consiste numa duplicação da região 16p12.3 de 499 kb, que envolve os genes *ACSM3*, *DNAH3*, *ACSM2B*, *ACSM1*, *THUMPD1*, *ERI2*, *LOC81691*, *DCUN1D3* e *LYRM1*.

Quanto à alteração presente no cromossoma 4, esta está presente na DGV com pouca frequência e coincide com uma deleção descrita no DECIPHER, que está associada a atraso mental, estrabismo, clinodactilia do 5º dedo, implantação baixa das orelhas e *shawl scrotum*. O atraso mental e o estrabismo descritos neste caso do DECIPHER assemelham-se às manifestações da paciente em estudo. O gene *LRBA*

(*LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing*) está presente na base de dados do OMIM (OMIM *606453), por estar relacionado à patologia de imunodeficiência-8 com autoimunidade (OMIM #614700). Este gene codifica uma proteína que contém um domínio altamente conservado e que é expressa em todos os tecidos, estando envolvida na regulação do tráfico endossomal, particularmente na endocitose de recetores ativados por ligantes¹⁴⁶. Nesta paciente não há indicação de nenhuma patologia relacionada com este gene, por isso, apesar do caso que se encontra descrito no DECIPHER, não é possível concluir acerca da patogenicidade desta CNV para o fenótipo da paciente em estudo.

Quando à alteração no cromossoma 16, esta duplicação não está descrita na DGV. Já no DECIPHER, estão reportados alguns casos com duplicações da mesma região, embora que na sua maioria, sejam mais extensas do que a encontrada na paciente. Estas alterações estão associadas a fenótipos de atraso mental, autismo, atraso global do desenvolvimento, anomalias faciais e hipoplasia do corpo caloso. Os genes *ACSM3* (OMIM *145505), *DNAH3* (OMIM *603334), *ACSM2B* (OMIM *614359), *ACSM1* (OMIM *614357), *DCUN1D3* (OMIM *616167) e *LYRM1* (OMIM *614709) estão descritos no OMIM. Apenas o gene *ACSM3* (*acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3*) está associado a uma patologia, a hipertensão. No entanto, nenhum destes genes foi associado a qualquer sintoma que esta paciente apresenta, não sendo possível concluir com certezas que esta alteração é patogénica neste caso.

Nesta paciente, foram encontradas alterações que provavelmente explicam as manifestações de défice cognitivo e estrabismo, mas não se encontraram evidências de que estas mesmas alterações possam estar ligadas à insensibilidade à dor que a paciente demonstra. É importante ter em conta que podem existir outras anomalias genómicas, não detetadas por *array-CGH*, ou que algum dos genes afetados pelas alterações encontradas possa estar associado a este sintoma, mas a sua função ainda não ser completamente conhecida.

Alterações provavelmente patogénicas (II)

Caso 16

Este caso refere-se a um paciente do sexo masculino que iniciou o estudo genético aos 12 anos de idade. Os sintomas clínicos que manifesta são défice cognitivo, antecedentes de hipotonia e perturbação da linguagem expressiva. O *array-CGH* revelou uma deleção na região 1q43 de 57 kb que envolve o gene *CHRM3* e que foi classificada como II (Figura 33).

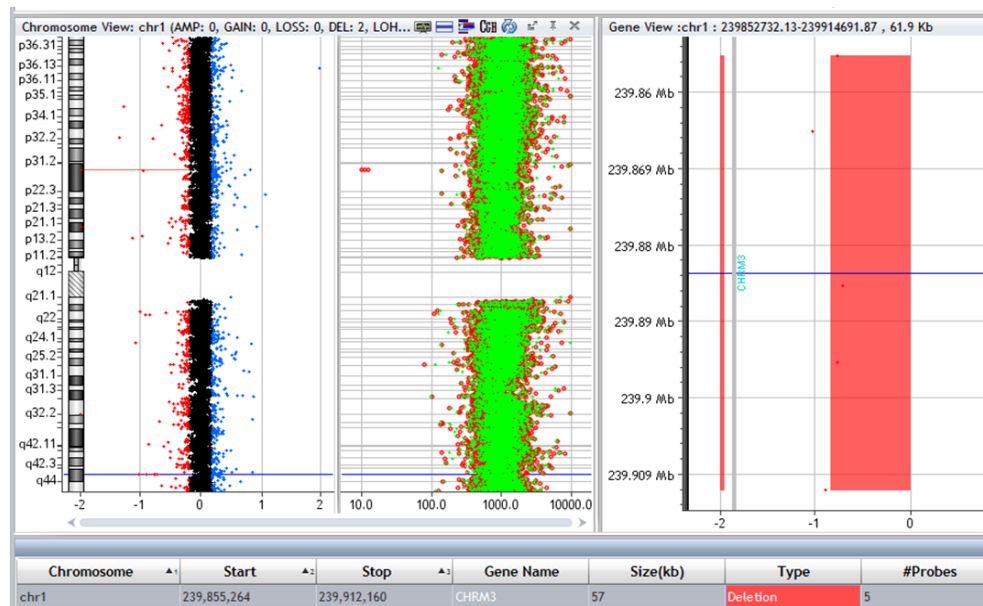


Figura 33 – Resultado do array-CGH no caso 16, demonstrando a deleção na região 1q43 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Esta alteração, para além de não estar presente na DGV, é sobreposta com algumas alterações reportadas em vários casos no DECIPHER, que descrevem fenótipos de atraso mental, microcefalia, atraso no desenvolvimento global, hipoplasia do corpo caloso. No OMIM, o gene *CHRM3* (Cholinergic Receptor, Muscarinic 3) (OMIM *118494) está relacionado ao fenótipo de ausência de músculos abdominais, anomalias no trato urinário e criptorquidia (OMIM #100100). No entanto, de acordo com a indicação clínica disponível, este fenótipo não coincide com o do paciente em estudo e apenas se pode formular a hipótese de que os antecedentes de hipotonia possam estar relacionados com a ausência de músculos abdominais, reportada anteriormente. Em 2012, um estudo reportou um caso de um indivíduo com manifestações de atraso mental, criptorquidia, baixa estatura e alopecia e que possuía uma deleção *de novo* na região 1q43, abrangendo os genes *CHRM3*, *RPS7P5* e *FMN2*¹⁴⁷. No ano seguinte, foi descrita uma deleção de 473 kb na mesma região envolvendo apenas o gene *CHRM3*. Neste caso, o indivíduo foi diagnosticado com um espectro autista, caracterizado por isolamento, problemas de alimentação e comportamentos estereotipados repetitivos¹⁴⁸.

Os recetores muscarínicos pertencem a uma família de recetores da membrana celular acoplados a proteínas G. Estes recetores distribuem-se pelo sistema nervoso central, músculos lisos, glândulas exócrinas e músculos cardíacos. Existem cinco subtipos (M1 a M5) codificados por genes diferentes. O recetor muscarínico M3 demonstra um papel importante na contração dos músculos lisos das

vias aéreas, na secreção do tecido glandular, na regulação do músculo detrusor e na acomodação ocular¹⁴⁸.

Neste caso, a deleção é de um tamanho reduzido e abrange apenas uma região intrónica do gene *CHRM3*, o que não permite tirar conclusões acerca da sua patogenicidade, apesar de não se poder por de lado a possibilidade de afetar o padrão de expressão do gene. Para além disto, não foi possível até à data, o estudo dos familiares, impossibilitando a determinação da origem da alteração. O qPCR foi realizado com uma sonda para o intrão 3 do gene *CHRM3* apenas para validação da alteração no paciente, permitindo confirmar a deleção, uma vez que se verificou apenas a existência de uma cópia do gene (Figura 34).

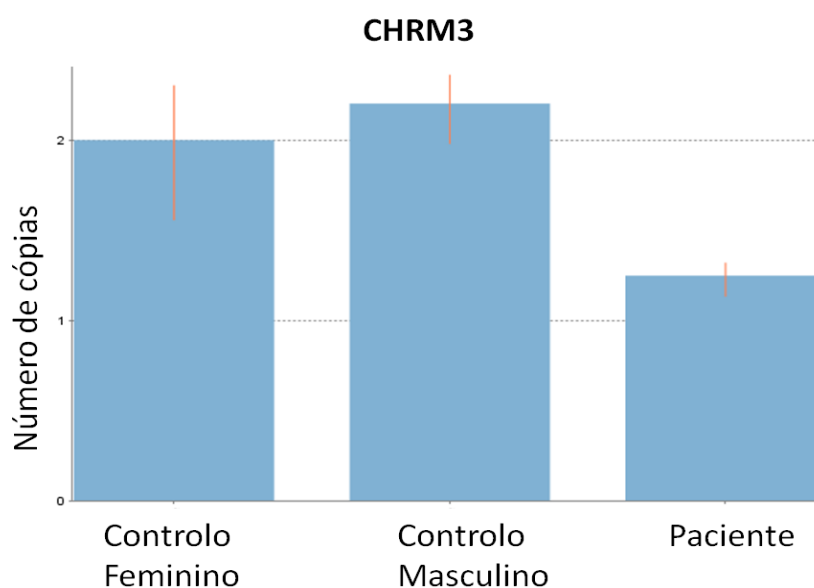


Figura 34 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do software CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *CHRM3* determinadas no paciente 16, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Caso 17

O caso 17 refere-se a um paciente referenciado para estudo genético aos 27 anos devido à presença de défice cognitivo, epilepsia, alteração dos movimentos oculares, hépato-esplenomegalia, microcefalia, hipotonia, lábio superior fino. A técnica de *array*-CGH permitiu identificar uma deleção na região 1q43 (a mesma região cromossómica descrita no caso 16, mas com posições genómicas diferentes) com aproximadamente 115 kb envolvendo o gene *RYS2* (Figura 35).

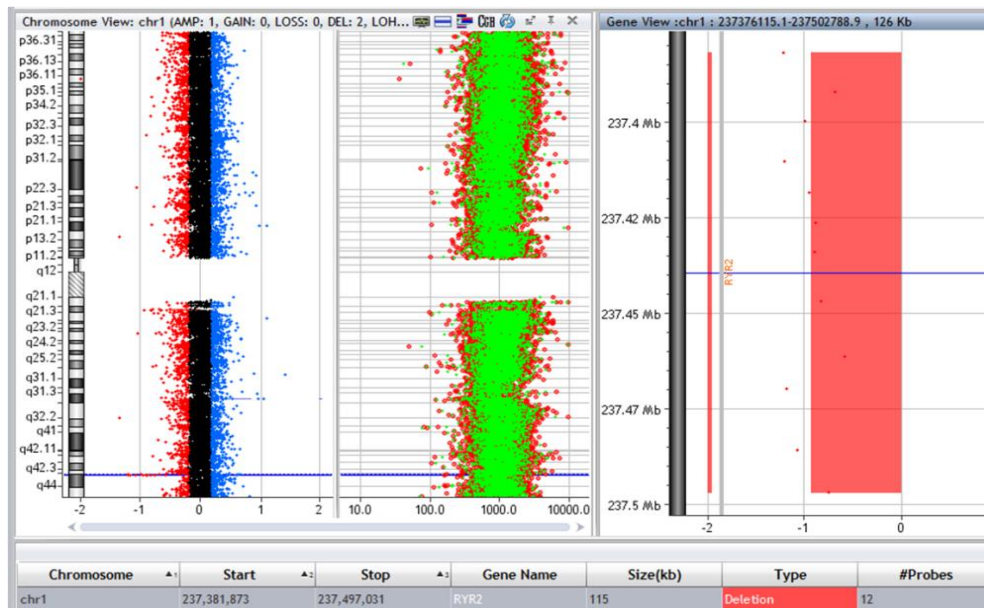


Figura 35 – Resultado do array-CGH no caso 17, demonstrando a deleção na região 1q43 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Esta alteração, para além de não estar presente na DGV, encontra-se reportada em vários casos no DECIPHER, estando relacionada com fenótipos de atraso mental, microcefalia, hipoplasia do corpo caloso, entre outros, o que coincide com alguns dos sintomas apresentados pelo paciente em estudo. No OMIM, o gene *RYR2* (ryanodine receptor 2) (OMIM *180902) está relacionado a fenótipos de patologias no coração, o que não se parece identificar com o paciente em causa, segundo a informação clínica disponível. Este gene codifica um recetor de rianodina do canal de libertação de cálcio presente no cérebro e no coração¹⁴⁹. A sua ação no cérebro pode estar relacionada com as manifestações de défice cognitivo, microcefalia, epilepsia demonstradas pelo paciente.

No caso deste paciente, apenas a mãe deste estava disponível para estudo genético. O qPCR foi realizado par validação desta alteração e para determinação da presença da alteração na mãe, utilizando uma sonda localizada no exão 2 e intrão 2 do gene *RYR2*. Os resultados permitem validar a alteração no paciente, que mostrou possuir apenas uma cópia do gene. A mãe do paciente não possui a mesma alteração, pois foram detetadas duas cópias do gene *RYR2* (Figura 36). Como o pai do paciente não se encontrou disponível para estudo genético, não foi possível concluir a origem desta CNV.

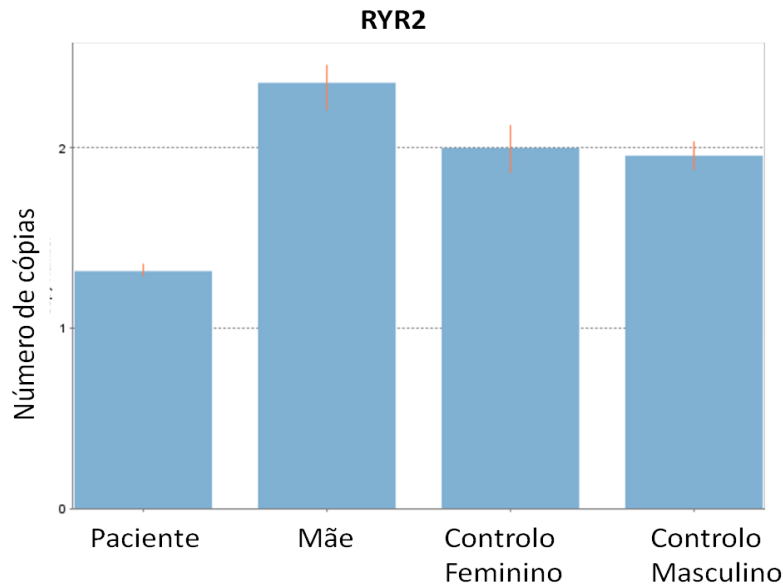


Figura 36 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene RYR2 determinadas no paciente 17 e na sua mãe, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Neste paciente foi ainda encontrada uma duplicação na região Xp22.33 ou Yp11.32, que corresponde à região pseudoautosómica 1 (PAR1), uma das regiões em que existe homologia entre os cromossomas sexuais e que emparelham e sofrem recombinação durante a meiose¹⁵⁰. Esta duplicação de 66 kb atinge os genes *CSF2RA* e *MIR3690*. A técnica de *array*-CGH não permite determinar em que cromossoma, X ou Y, se encontra esta duplicação.

No DECIPHER estão reportados alguns casos de duplicações nesta região, tanto no cromossoma X como no cromossoma Y, no entanto em todos os casos trata-se de duplicações de maior tamanho do que a observada no paciente. No OMIM, o gene *CSF2RA* (OMIM *306250) não está associado a nenhum fenótipo semelhante ao do paciente. Um estudo de 2014 demonstrou que as variações no número de cópias na PAR1 podem constituir polimorfismos de comprimento desta região¹⁵¹. Neste caso, não foram realizados mais estudos desta alteração, por isso não se conseguiu determinar a sua origem. Assim, não é possível determinar a sua contribuição para o fenótipo clínico apresentado por este paciente.

Caso 18

O caso 18 é o de um paciente de 16 anos cuja indicação clínica refere défice cognitivo, epilepsia mioclónica, displasia dentária e estrabismo. A técnica de *array*-CGH permitiu identificar uma deleção na citobanda 2q33.3 de 18 kb que inclui os

genes *FASTKD2*, *MIR3130-1* e *MIR3130-2* (Figura 37). Esta alteração foi classificada como II.

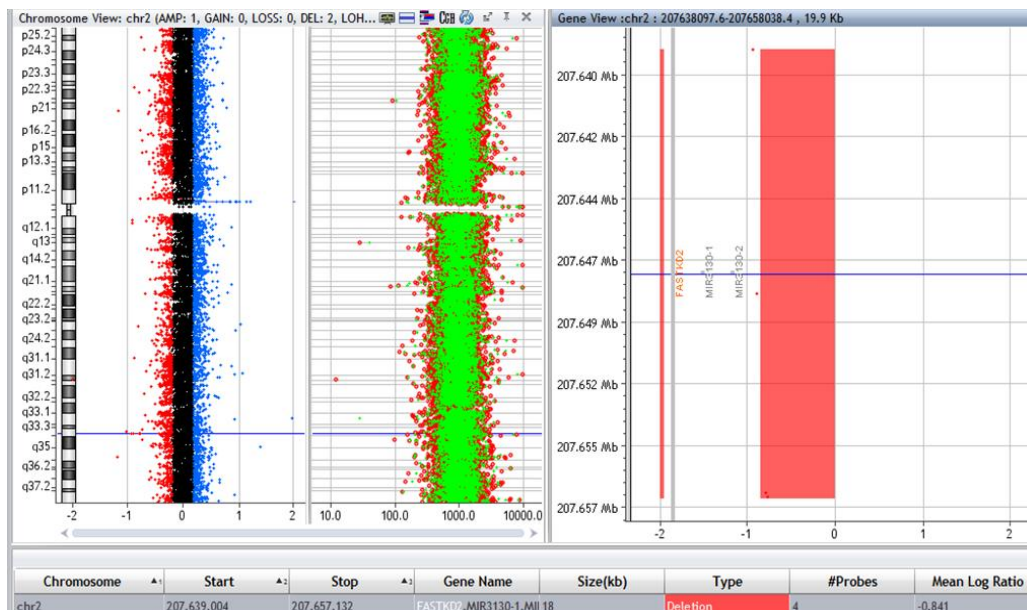


Figura 37 – Resultado do array-CGH no caso 18, demonstrando a deleção na região 2q33.3 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Esta alteração não está descrita na DGV. No DECIPHER estão descritos alguns casos de deleções na região, embora mais extensas do que a deleção observada neste paciente. Nestes casos, algumas das características presentes são o atraso mental, anomalias dos dentes, retrognatia, hipotonia, epilepsia, coloboma, anomalias da face, assemelhando-se ao fenótipo do paciente. Tal como descrito no OMIM, o gene *FASTKD2* (FAST kinase domains 2) (OMIM *612322) demonstra uma expressão em todos os tecidos, mas mais acentuada no músculo esquelético e tem um papel importante na apoptose mitocondrial. Mutações que levam à perda de função deste gene têm sido associadas à deficiência do complexo IV mitocondrial¹⁵², mas não é possível concluir se esta patologia pode estar relacionada com o fenótipo do paciente. Mesmo assim, foi realizado o qPCR para validação da alteração encontrada, que permitiu confirmar a presença de apenas uma cópia deste gene (Figura 38).

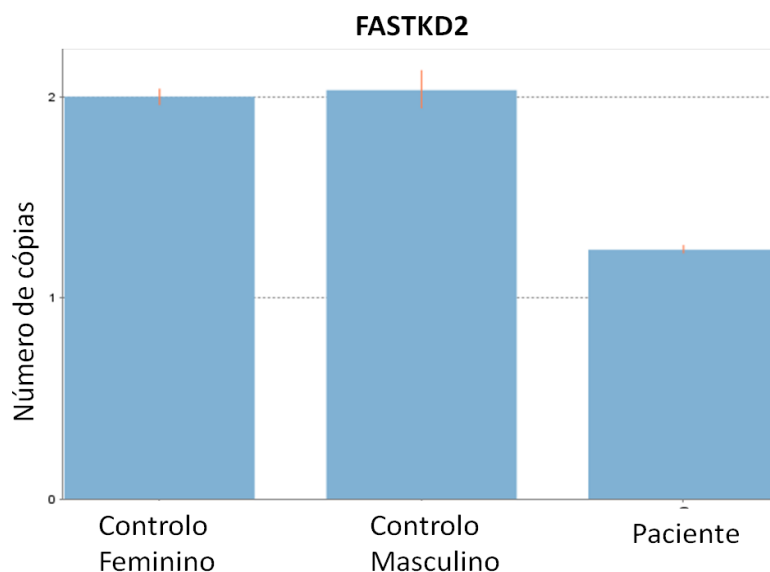


Figura 38 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene FASTKD2 determinadas no paciente 18, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Neste paciente foi ainda encontrada outra alteração classificada como IIIA, uma deleção na citobanda 9p22.1 com 25 kb e que atinge o gene *PLIN2*. Esta alteração não está presente na DGV e no DECIPHER estão descritas algumas deleções na mesma região, mas com maior extensão. Os sintomas descritos no DECIPHER são atraso mental, atraso geral no desenvolvimento, epilepsia, microretrognatia, entre outros. Estas características assemelham-se aos sintomas apresentados pelo paciente apresentado neste caso, tal como na CNV discutida anteriormente, no entanto, como as alterações encontradas são de tamanho inferior àsquelas presentes na base de dados do DECIPHER, não se pode concluir com toda a certeza que a causas do fenótipo seja a mesmas. O gene *PLIN2* (*perilipin 2*) (OMIM *103195) codifica uma proteína da família das perilipinas que regulam o armazenamento e a hidrólise de lípidos e foi encontrado em CNVs presentes em indivíduos com obesidade¹⁵³.

Tendo em conta a informação disponível, não é possível concluir acerca da patogenicidade das CNVs encontradas e da sua contribuição para o fenótipo clínico manifestado pelo paciente em causa.

Caso 19

Trata-se de um paciente de 14 anos que apresenta atraso muito grave de desenvolvimento cognitivo, estatura muito elevada, défice de linguagem expressivo, escoliose e estrabismo. Neste paciente foi encontrada uma CNV classificada como II, que consiste numa duplicação da região 2q33.1 com 437 kb e que incluiu os genes *SATB2* e *FLJ32063* (Figura 39).

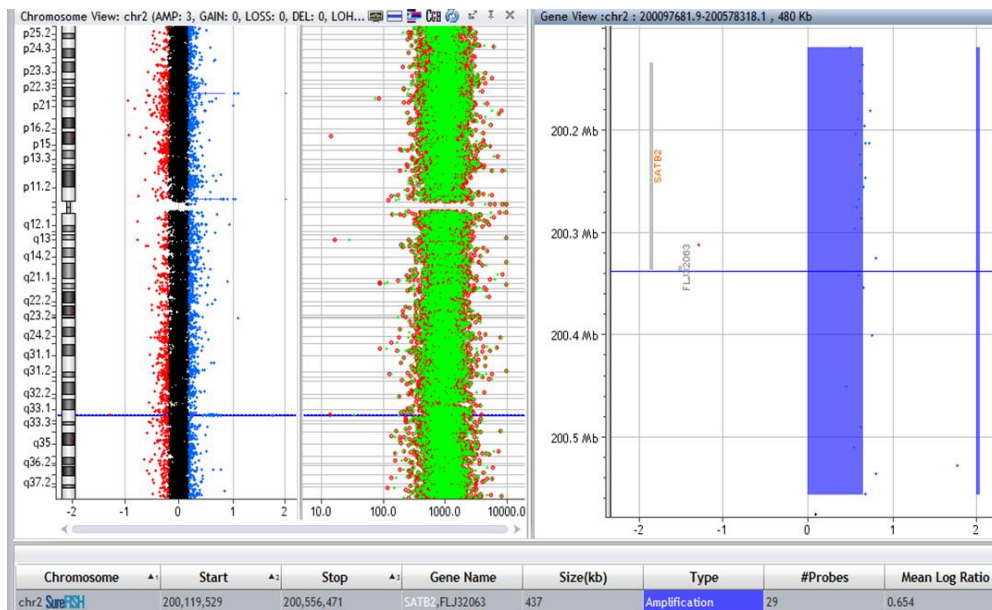


Figura 39 – Resultado do array-CGH no caso 19, demonstrando a duplicação na região 2q33.1 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER, estão reportadas algumas duplicações na mesma região, referindo o atraso mental como principal manifestação causada, referindo também atraso no desenvolvimento da linguagem, o que coincide com as características apresentadas pelo indivíduo em estudo.

O gene *SATB2* (*special AT-rich sequence-binding protein 2*) (OMIM *608148) codifica uma proteína envolvida na remodelação da cromatina e na regulação da transcrição e as alterações em que está envolvido, sejam elas duplicações, deleções ou translocações, têm sido associadas a fenótipos variáveis de atraso mental sindrómico, incluindo distúrbios comportamentais, dismorfias faciais, linguagem reduzida, osteoporose^{154; 155}. No caso das deleções, a haploinsuficiência do gene é a razão pelo aparecimento de sintomas, no entanto, estes assemelham-se àqueles observados em pacientes com duplicações, o que poderá significar que a duplicação altere também a dosagem deste gene^{155; 156}.

Foi realizado o qPCR para validação da alteração e para estudo genético dos progenitores, utilizando-se uma sonda específica para o intrão 4 e exão 5 do gene *SATB2*. Os resultados, para além de validarem a alteração do paciente, demonstram que esta foi herdada do pai, que apresenta três cópias do gene, enquanto a mãe apresenta duas (Figura 40).

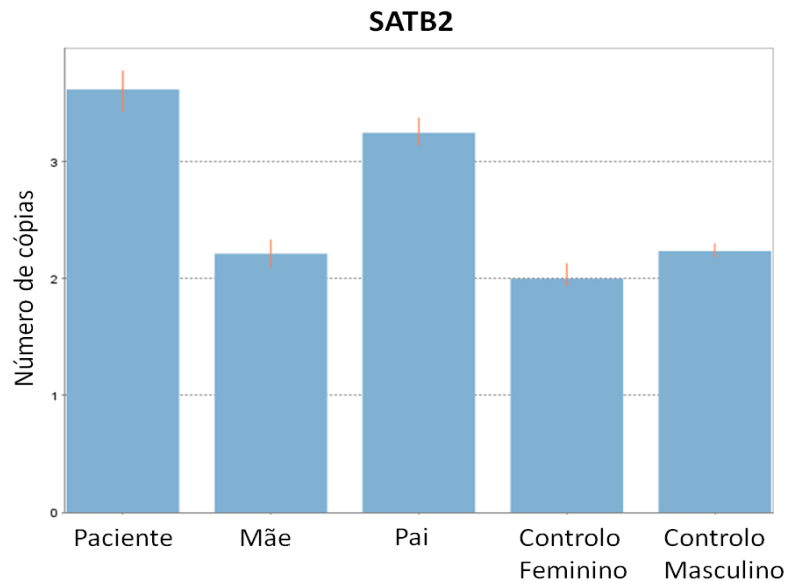


Figura 40 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene SATB2 determinadas no paciente 19 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Tendo em conta estudos anteriores, esta alteração é provavelmente patogénica e responsável pelo fenótipo do paciente em estudo. O pai do paciente não é aparentemente afetado, não apresentando as mesmas características clínicas, o que sugere que esta alteração possa estar associada a penetrância incompleta. No entanto, a maioria das informações sobre alterações nesta região cromossómica são referentes a deleções, sendo necessário mais estudos de pacientes que apresentem duplicações da mesma região, assim como dos seus familiares.

Caso 20

O caso 20 trata-se de uma paciente de 14 anos que apresenta défice cognitivo moderado. De referir que nesta família poderá tratar-se de uma alteração herdada, uma vez que o pai apresenta também um défice cognitivo importante. Através de *array*-CGH, foi encontrada uma alteração classificada como II, que consiste numa deleção da citobanda 9q33.1 de 48 kb que envolve o gene *ASTN2* (Figura 41).

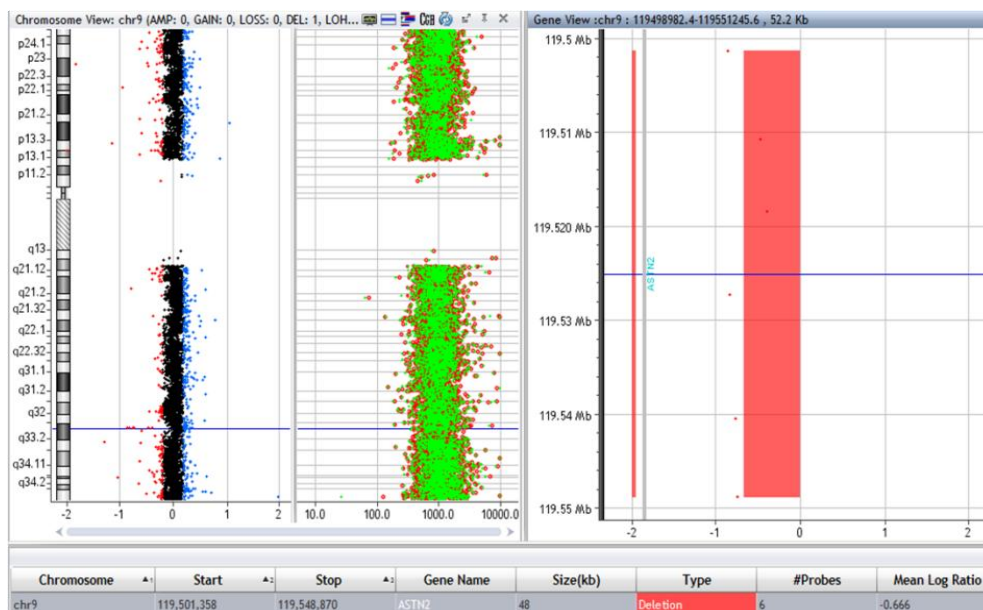


Figura 41 – Resultado do array-CGH no caso 20, demonstrando a duplicação na região 9q33.1 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER estão descritos vários casos de deleções nesta região, que apresentam fenótipos maioritariamente caracterizados por atraso mental e atraso geral do desenvolvimento. As CNVs que envolvem o gene *ASTN2* (*Astrotactin 2*) (OMIM *612856) foram já relacionadas com o atraso mental, autismo, défice de atenção, hiperatividade e esquizofrenia¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Este gene é expresso no cérebro, sendo encontrado tanto no período de desenvolvimento como no cérebro adulto, mostrando picos de expressão no período pós-natal. A proteína codificada por este gene tem como função a regulação da expressão de *ASTN1* na superfície celular, que por sua vez, contribui para a migração neuronal¹⁶¹.

Neste caso foi realizada a técnica de qPCR para validação da alteração da paciente e para estudo dos familiares disponíveis, a mãe, o pai e o irmão, utilizando uma sonda para o gene *ASNT2*. A alteração foi validada na paciente, demonstrando apenas uma cópia do gene. Ao contrário do que se pensava, o pai apresentou duas cópias do gene, enquanto a mãe e o irmão apenas possuem uma cópia do gene (Figura 42). Tendo em conta os casos já descritos e a função do gene envolvido nesta CNV, é provável que esta CNV contribua para o défice cognitivo demonstrado pela paciente. No entanto, tendo em conta a presença de um défice cognitivo no pai e de duas cópias do gene *ASTN2*, não será de descartar a hipótese de um segundo evento, presente no pai e herdado pela filha, que possa ter um efeito aditivo para o fenótipo da paciente. Por outro lado, estando a deleção do gene *ASTN2* presente na mãe e no irmão da paciente e não havendo informação clínica relevante sobre estes indivíduos, será necessário também colocar a hipótese de que esta CNV possa apresentar uma

penetrância incompleta, causando um fenótipo mais grave na paciente do que nos seus familiares também portadores.

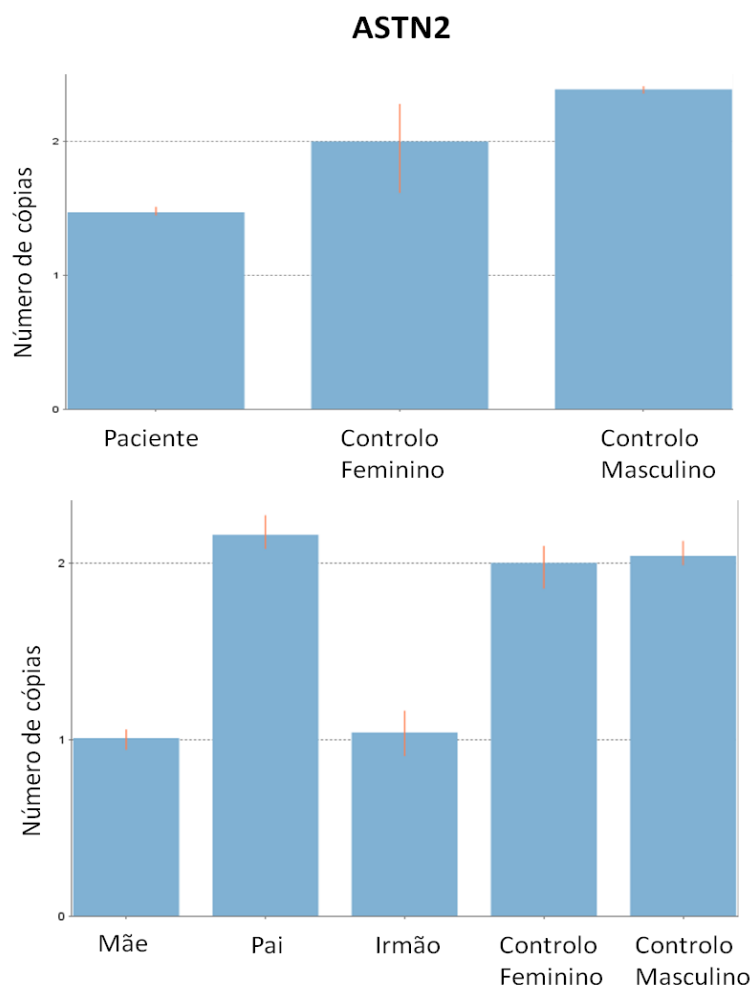


Figura 42 – Gráficos representativos do resultado do qPCR obtidos através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene ASTN2 determinadas no paciente 20 e nos seus familiares, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Nesta paciente foi ainda encontrada uma CNV classificada como IIIA. Trata-se de uma duplicação na região 17p11.2 de 194 kb que envolve os genes *KCNJ12*, *KCNJ18* e *C17orf51*. Esta alteração está presente na DGV com baixa frequência e no DECIPHER estão descritas duplicações desta região, embora bastante mais extensas, em alguns casos de atraso mental, autismo e atraso global do desenvolvimento. O gene *KCNJ12* (*potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 12*) (OMIM *602323) já foi encontrado em alterações desta região em casos de atraso mental¹⁶², no entanto, a alteração encontrada nesta paciente apenas afeta uma parte deste gene. Assim, não é possível tirar conclusões claras sobre a patogenicidade desta CNV neste caso, nem foi realizado o estudo dos progenitores, para avaliar se esta pode ser a alteração responsável por uma possível história

familiar de défice cognitivo. Ainda assim, pode-se especular que a interação entre estas duas CNVs (ou um efeito aditivo) poderá ser responsável pelo défice cognitivo moderado observado na paciente em estudo.

Caso 21

Este caso trata-se de uma paciente com apenas 3 anos que apresenta um fenótipo caracterizado por défice cognitivo, *pectus excavatum* e dismorfias faciais, entre as quais, lábio fino. Através de array-CGH foi possível encontrar uma alteração considerada provavelmente patogénica (II), que consiste numa duplicação da região 16p13.11 de 1323 kb, envolvendo os genes *NPIP*, *RRN3*, *NDE1*, *MYH11*, *ABCC1*, *ABCC6*, *NOMO1*, *MIR3179-1*, *MIR3179-2*, *MIR3179-3*, *MIR3180-1*, *MIR3180-3*, *MIR3180-2*, *PDXDC1*, *NTAN1*, *MIR31804*, *MPV17L*, *C16orf45*, *KIAA0430*, *MIR484* e *FOPNL* (Figura 43).

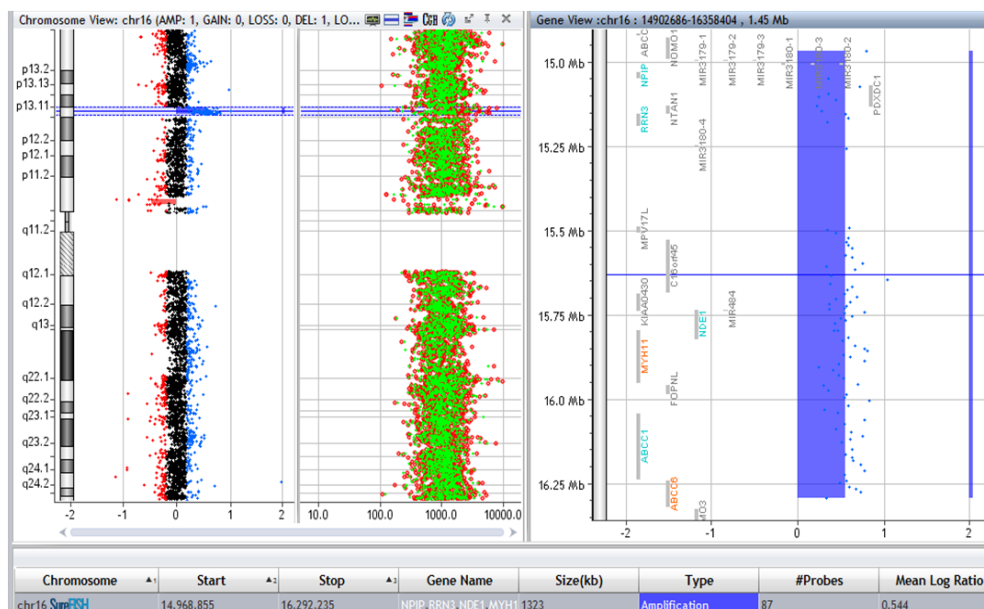


Figura 43 – Resultado do array-CGH no caso 21, demonstrando a duplicação na região 16p13.11 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Duplicações desta região estão descritas num grande número de casos no DECIPHER, associados principalmente a atraso mental e dismorfias. Nesta base de dados é descrita também a síndrome de microduplicação 16p13.11, como uma região de suscetibilidade a doenças neurodegenerativas. As alterações nesta região têm sido reportadas como prováveis causas de autismo e atraso mental¹⁶³, existindo autores que sugerem que as duplicações têm mais probabilidade de serem benignas do que as deleções¹⁶⁴. É também uma alteração conhecida por apresentar uma penetrância incompleta e um estudo de 2013 sugere uma possível influência do sexo na penetrância destas CNVs, pois na amostra estudada a patogenicidade demonstrou ser

mais elevada nos indivíduos do sexo masculino¹⁶⁵. Este estudo sugere ainda que os genes *NDE1*, *MYH11*, *ABCC1* e *ABCC6* são possíveis responsáveis pelos fenótipos observados nos indivíduos que possuem alterações desta região. O gene *NDE1* (*nudE neurodevelopment protein 1*) (OMIM *609449) aparenta ser o gene com mais influência nos fenótipos destes indivíduos, pois tem um papel importante no neurodesenvolvimento. Codifica uma proteína do centrossoma que está envolvida na mitose, na migração dos neurónios e na organização dos microtúbulos durante o desenvolvimento cerebral, apresentando um papel fundamental no processo de encefalização dos mamíferos e no crescimento do córtex cerebral humano¹⁶⁶. O gene *MYH11* (*myosin, heavy chain 11, smooth muscle*) (OMIM *160745) é o gene que, mais provavelmente, causa os defeitos na aorta torácica presentes em alguns indivíduos com estas alterações, pois codifica uma proteína contrátil produzida nas células do músculo liso¹⁶⁷. Os genes *ABCC1* (*ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1*) (OMIM *158343) e *ABCC6* (*ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6*) (OMIM *603234) não estão associados a distúrbios do neurodesenvolvimento, mas foi demonstrado que alterações no gene *ABCC6* causam uma doença genética caracterizada por mineralização distrófica dos tecidos conjuntivos moles em vários órgãos, incluindo na pele, olhos e artérias sanguíneas¹⁶⁸.

Para esta alteração foi realizada a validação por qPCR e o estudo genético dos progenitores desta paciente, utilizando uma sonda para o exão 8 do gene *NDE1*. Os resultados permitiram validar a alteração na paciente e observar que esta foi herdada do pai, pois ambos apresentam três cópias do gene (Figura 44).

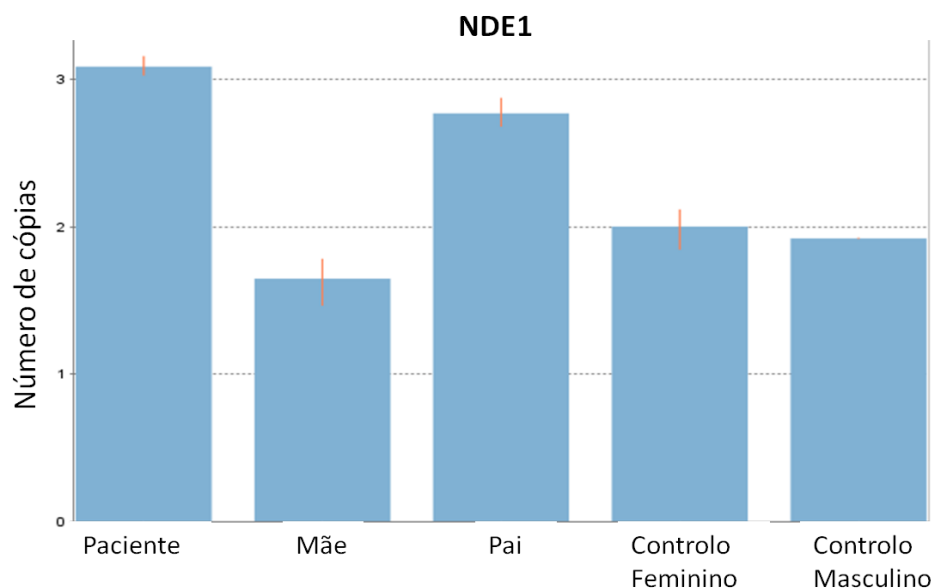


Figura 44 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do software CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *NDE1* determinadas no paciente 21 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Estes resultados estão de acordo com a penetrância incompleta conhecida desta região, pois de acordo com a informação disponível o pai não é afetado. Ainda assim, estes resultados contrariam a ideia de que a penetrância desta alteração possa ser influenciada pelo sexo masculino, mas trata-se apenas de uma família com dois portadores e, por isso, não é possível tirar conclusões. Assim, tendo em conta os casos descritos e o conteúdo génico desta alteração, conclui-se que muito provavelmente é uma variável patogénica e responsável pelo fenótipo clínico observado nesta paciente.

Nesta paciente foi ainda encontrada uma deleção classificada como IIIA na citobanda 9p24.3, a mesma alteração encontrada no paciente 1, que envolve o gene *KANK1*. Para esta alteração não foi possível realizar o estudo genético dos progenitores, por isso não foi determinada a origem da deleção. Para além disso, o fenótipo da paciente não parece assemelhar-se aos descritos em indivíduos com a mesma alteração. Assim, não é possível concluir acerca da sua patogenicidade.

Caso 22

Este caso refere-se a um paciente do sexo masculino que foi referenciado para estudo genético aos 12 anos, por apresentar défice cognitivo. Neste paciente foi encontrada uma deleção classificada como II, na região 16p13.3 com 75 kb e que envolve o gene *RBFOX1* (Figura 45). De acordo com as informações do Ensembl, as coordenadas genómicas desta deleção localizam-se no intrão 3 do gene.

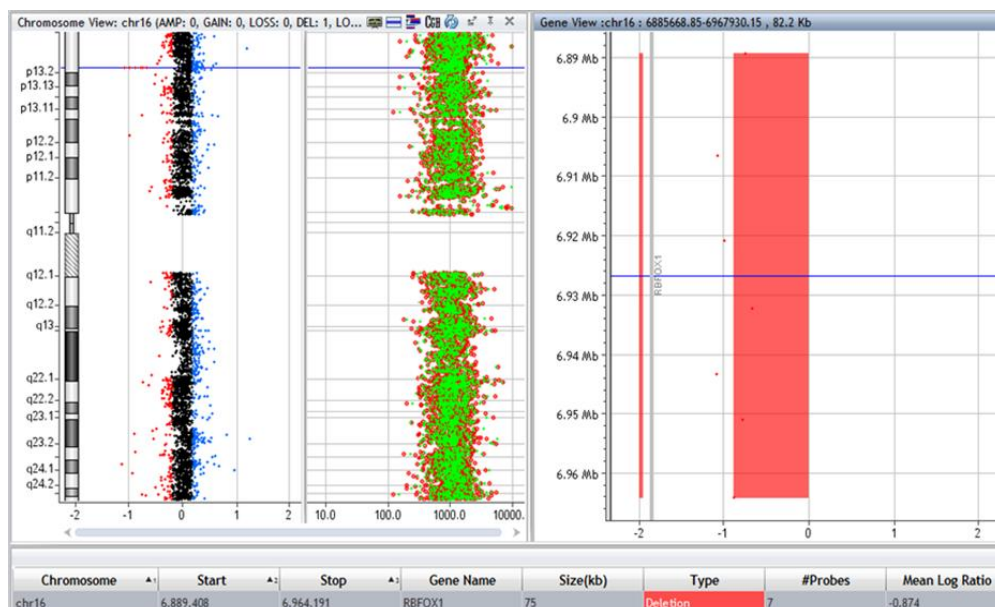


Figura 45 – Resultado do array-CGH no caso 22, demonstrando a deleção na região 16p13.3 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

Apesar de esta CNV estar presente na DGV, no DECIPHER estão descritas deleções na mesma região, associadas a fenótipos de atraso mental, atraso cognitivo, autismo, atraso no desenvolvimento da linguagem e atraso global do desenvolvimento. Em vários estudos, o gene *RBFOX1* (*RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans)*) (OMIM *605104) foi associado a doenças do neurodesenvolvimento, como atraso mental, autismo e epilepsia¹⁶⁹⁻¹⁷⁴. Este gene codifica um fator de *splicing* pertencente à família Fox, que é expresso no coração, nos músculos e nos tecidos neuronais. Este fator regula o *splicing* alternativo específico dos tecidos, por se ligar a uma sequência (U)GCAUG nos intrões flanqueantes dos exões dos seus genes alvo¹⁷⁵⁻¹⁷⁹.

Foi realizado o qPCR para validação da alteração e para estudo dos progenitores deste paciente, utilizando uma sonda para o gene *RBFOX1*. Os resultados permitiram validar a deleção no paciente e verificar que esta alteração foi herdada da mãe, uma vez que esta, apresenta apenas uma cópia deste gene, tal como o seu filho (Figura 46).

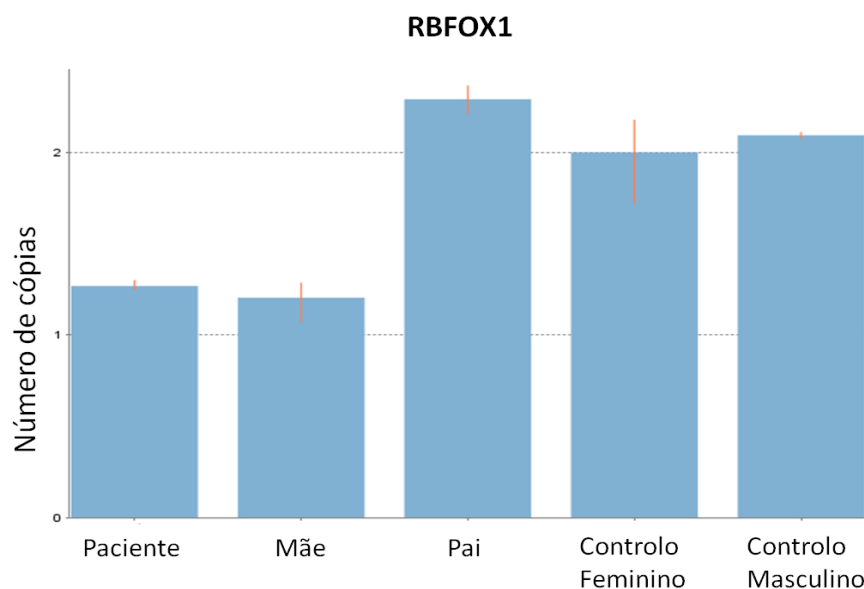


Figura 46 – Gráfico representativo do resultado do qPCR obtido através do *software* CopyCaller™, esquematizando o número de cópias do gene *RBFOX1* determinadas no paciente 22 e nos seus progenitores, relativamente aos controlos feminino e masculino.

Uma vez que é uma deleção intrónica, não é possível concluir com toda a certeza de que esta alteração é responsável pelo défice cognitivo apresentado por este paciente. Mas, tendo em conta os dados bibliográficos e os casos descritos, há possibilidade de esta alteração apresentar também patogenicidade neste paciente, uma vez que a deleção do intrão 3 do gene *RBFOX1* pode afetar alguma região reguladora.

Caso 23

Este caso refere-se a um paciente de 16 anos que apresenta défice cognitivo e hemiparesia. Neste paciente foi encontrada uma alteração classificada como II que consiste numa duplicação da região 8p21.3 de 148 kb que afeta os genes *PPP3CC* e *SLC39A14* (Figura 47).

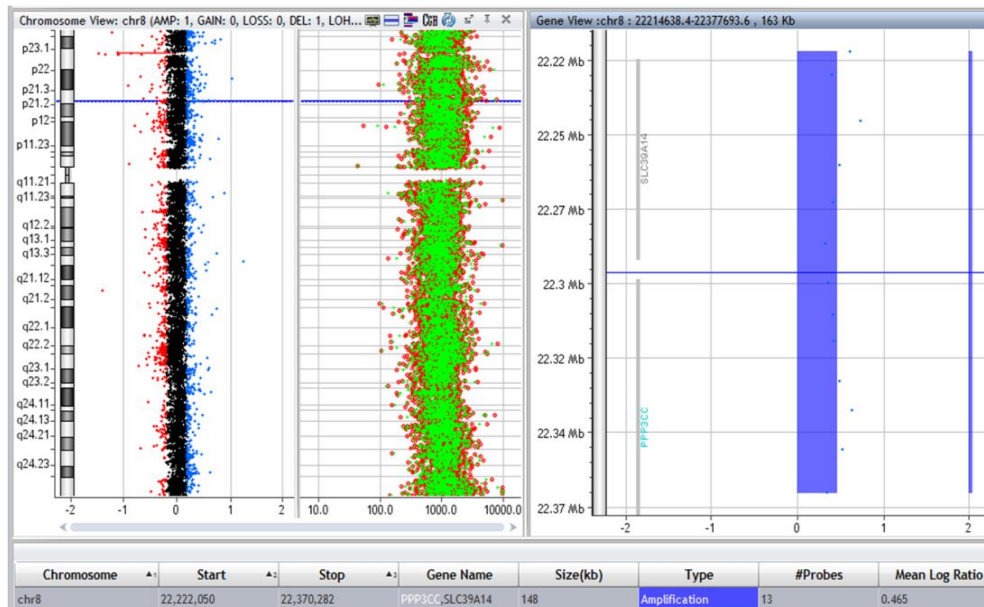


Figura 47 – Resultado do array-CGH no caso 23, demonstrando a deleção na região 8p21.3 e a sua região cromossómica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região.

No DECIPHER estão descritos casos com duplicações na mesma região, mas a maioria das alterações apresenta-se mais extensa do que a encontrada neste paciente. Para além disso, esta alteração não está presente na DGV. Os fenótipos presentes no DECIPHER associados a duplicações nesta região caracterizam-se maioritariamente por atraso mental, atraso global do desenvolvimento, hipotonia, hipoplasia do corpo caloso. Nesta alteração, o gene que mais provavelmente estará ligado ao fenótipo do paciente é o *PPP3CC* (*protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isozyme*) (OMIM *114107). Este gene codifica uma calcineurina e tem sido associado à esquizofrenia, pois alterações nesta proteína podem ter efeitos na função neuronal¹⁸⁰.

Neste caso não foi possível realizar o qPCR, no entanto, concluiu-se que esta alteração seria provavelmente patogénica e que pode estar envolvida no fenótipo do paciente.

Neste paciente foram ainda encontradas três alterações classificadas como IIIA. Uma das alterações consiste numa duplicação da região 18p11.22 com 366 kb, envolvendo os genes *ANKRD12*, *TWSG1* e *RALBP1*, tal como foi encontrado no

paciente do caso 2. Tal como já foi referido, esta alteração não está presente na DGV nem no DECIPHER, mas o gene *ANKRD12* é expresso no cérebro⁷⁷.

Foi encontrada uma outra alteração localizada na região pseudoautosómica Xp22.33 ou Yp11.32, tal como no paciente do caso 17. Neste paciente, a alteração afeta o gene *ASMT* e consiste numa duplicação de 55 kb. Esta alteração está presente em vários casos do DECIPHER que apresentam atraso mental, atraso global do desenvolvimento, autismo e distúrbios comportamentais. O gene *ASMT* (*acetylserotonin O-methyltransferase*) (OMIM *300015) codifica a proteína envolvida no último passo da via metabólica da síntese da melatonina, um péptido que é produzido durante a noite na glândula pineal, estimulada pelo núcleo supraquiasmático presente no hipotálamo. Os recetores da melatonina são expressos nos sistemas nervoso, digestivo, endócrino e cardiovascular^{181; 182}. Este gene tem sido apontado como causador de doenças mentais, nomeadamente o autismo^{181; 183; 184}. Tendo em conta que a duplicação presente neste paciente interrompe o gene *ASMT*, deve ser tido em conta a possibilidade do gene funcionar em haploinsuficiência, contribuindo para o fenótipo observado.

Por último, foi encontrada uma duplicação na região Xq22.2 de 42 kb que envolve os genes *MIR1256*, *H2BFWT* e *H2BFM*. Esta alteração está presente com baixa frequência na DGV e descrita em alguns casos de atraso mental do DECIPHER. O gene *H2BFWT* (*H2B histone family, member W, testis-specific*) (OMIM *300507) está presente no OMIM e está associado a situações de infertilidade masculina^{185; 186}. No entanto, nenhum dos genes, parece estar relacionado com o fenótipo deste paciente, não sendo possível concluir sobre a patogenicidade desta alteração.

Casos 24 e 25

Estes casos referem-se a duas irmãs gémeas monozigóticas de 20 anos que apresentam atraso cognitivo. Nestas duas pacientes foram encontradas duas alterações: uma deleção na região 22q13.33 provavelmente patogénica (II), de 153 kb que envolve os genes *MLC1*, *MOV10L1* e *IL17REL* (Figura 48) e uma duplicação na região 13q12.3 classificada como IIIA, com 1377 kb que envolve os genes *SLC7A1*, *UBL3*, *HMGB1*, *MTUS2*, *LOC440131*, *KATNAL1* e *LOC100188949*.

Quanto à deleção no cromossoma 22, esta alteração não está presente na DGV. Quando pesquisada no DECIPHER, estão presentes vários casos de deleções desta região que são associadas maioritariamente a autismo, atraso mental, hipotonia, atraso no desenvolvimento da linguagem, anomalias faciais e também a atraso cognitivo. Todos os genes abrangidos pela deleção estão presentes na base de dados do OMIM, mas o que parece ter mais influência no fenótipo das pacientes é o *MLC1*

(*megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1*) (OMIM *605908), um gene que codifica uma proteína membrana e é expresso principalmente no cérebro¹⁸⁷; ¹⁸⁸. Mutações deste gene estão associadas a leucoencefalopatia megalencefálica com cistos subcorticais, uma doença caracterizada por macrocefalia e deterioração neurológica tardia, incluindo ataxia cerebelar, espasticidade, epilepsia e défice cognitivo^{188; 189}.

A informação clínica destas pacientes não aponta para a existência desta patologia, uma vez que com 20 anos de idade, os sintomas já seriam visíveis. Apesar disso, o défice cognitivo que apresentam pode estar relacionado com a deleção do gene *MLC1*.

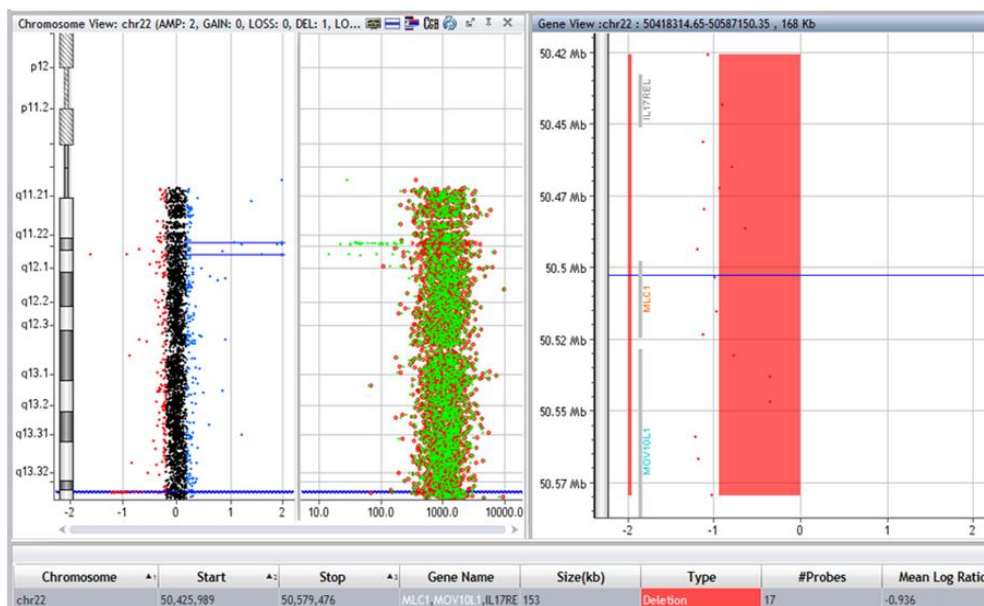


Figura 48 – Resultado do array-CGH no caso 24, demonstrando a deleção na região 22q13.33 e a sua região cromossômica, dimensão, genes afetados e número de sondas presentes na região. É apresentada apenas uma imagem correspondendo a uma das irmãs, visto que o resultado foi idêntico nos dois casos.

Quanto à alteração encontrada no cromossoma 13, esta também não se encontra na DGV e no DECIPHER estão descritos poucos casos de duplicações desta região, mas aquelas que mais se assemelham à duplicação presente nas duas irmãs em estudo, indicam atraso mental e motor e anomalias comportamentais. Os genes *SLC7A1* (OMIM *104615), *UBL3* (OMIM *604711), *HMGB1* (OMIM *163905) e *KATNAL1* (OMIM *614764) estão presentes na base de dados do OMIM. Em 2014, foi publicado um estudo que reporta três casos de indivíduos com deleções desta região e que apresentam atraso mental, microcefalia e dermatite atópica como principais alterações clínicas, mas também, dismorfias faciais similares¹⁹⁰. A região que contém os genes *HMGB1* e *KATNAL1* é sugerida como a região crítica desta deleção. O gene

KATNAL1 (*KATANIN p60 subunit A-like 1*) codifica uma ATPase com uma sequência muito semelhante à da *KATANIN p60* (*KATNA1*), um membro da família de enzimas de remodelação dos microtúbulos, que são altamente expressas no sistema nervoso¹⁹¹. O gene *HMGB1* (*High-mobility group box 1*), que pertence à família de proteínas nucleares *HMG-box*, codifica a proteína não-histónica mais abundante no núcleo e é expresso em todos os tecidos dos vertebrados¹⁹². Este gene está envolvido em vários processos celulares como a transcrição, replicação e recombinação e é importante no desenvolvimento cerebral¹⁹³. Apesar deste estudo se referir apenas a deleções desta região, os genes discutidos, pela sua função e expressão, podem ser responsáveis pela patogenicidade da alteração também em casos de duplicações. Assim, é importante considerar esta alteração como possivelmente patogénica nestas pacientes.

Caso 26

Este último caso trata-se de uma paciente de 17 anos que apresenta défice cognitivo e que já tinha realizado estudo do cariótipo onde se observou a presença de três cromossomas marcadores. Cromossomas marcadores supranumerários são definidos como cromossomas estruturalmente anormais que ocorrem em adição ao número normal de cromossomas num genoma humano diploide (46), não se conseguindo caracterizar recorrendo apenas a técnicas de citogenética convencional¹⁹⁴. Este tipo de cromossomas tem sido associado a fenótipos como atraso mental e dismorfismos¹⁹⁵.

A técnica de FISH permitiu identificar três sinais para os centrómeros dos cromossomas 7, 8 e 10, mas não permitiu avaliar a extensão das duplicações. A técnica de *array*-CGH foi realizada com esse intuito e permitiu confirmar as três duplicações que deverão corresponder ao material genético adicional presente nos cromossomas marcadores.

Das três duplicações presentes, duas foram consideradas como as mais provavelmente patogénicas, tendo em conta o tamanho e conteúdo génico envolvido. Assim, as duas duplicações classificadas como II foram: a duplicação na região 8p11.23p11.21 com 6168 kb e que envolvia os genes *ERLIN2*, *PROSC*, *GPR124*, *BRF2*, *RAB11FIP1*, *ADRB3*, *EIF4EBP1*, *ASH2L*, *STAR*, *LSM1*, *PPAPDC1B*, *WHSC1L1*, *FGFR1*, *TACC1*, *PLEKHA2*, *HTRA4*, *ADAM9*, *ADAM2*, *IDO1*, *IDO2*, *C8orf4*, *SFRP1*, *GIN54*, *AGPAT6*, *NKX63*, *ANK1*, *MYST3*, *PLAT*, *IKBKB*, *POLB*, *DKK4*, *VDAC3*, *SLC20A2*, *CHRNA3*, *THAP1*, *HOOK3*, *FNTA*, *HGSNAT*, *ZNF703*, *LOC728024*, *GOT1L1*, *BAG4*, *DDHD2*, *LETM2*, *C8orf86*, *RNF5P1*, *TM2D2*, *ADAM32*, *ADAM5P*, *ADAM3A*, *ADAM18*, *ZMAT4*, *GOLGA7*, *MIR486*, *AP3M2*, *C8orf40*,

CHRNA6, *RNF170*, *SGK196* e *POTEA*, a outra na região 10p11.21p11.1 com 3235 kb envolvendo os genes *CCNY*, *GJD4*, *FZD8*, *ANKRD30A*, *ZNF25*, *ZNF33A*, *MTRNR2L7*, *ZNF248*, *ZNF37A*, *LOC100129055*, *HSD17B7P2*, *SEPT7L* e *LOC399744*. A terceira alteração encontrada foi uma duplicação caracterizada como IIIA na região 7q11.21 de 952 kb e que envolve os genes *LOC643955*, *LOC100287704*, *LOC100287834*, *MIR4283-1* e *MIR4283-2* (Figura 49).

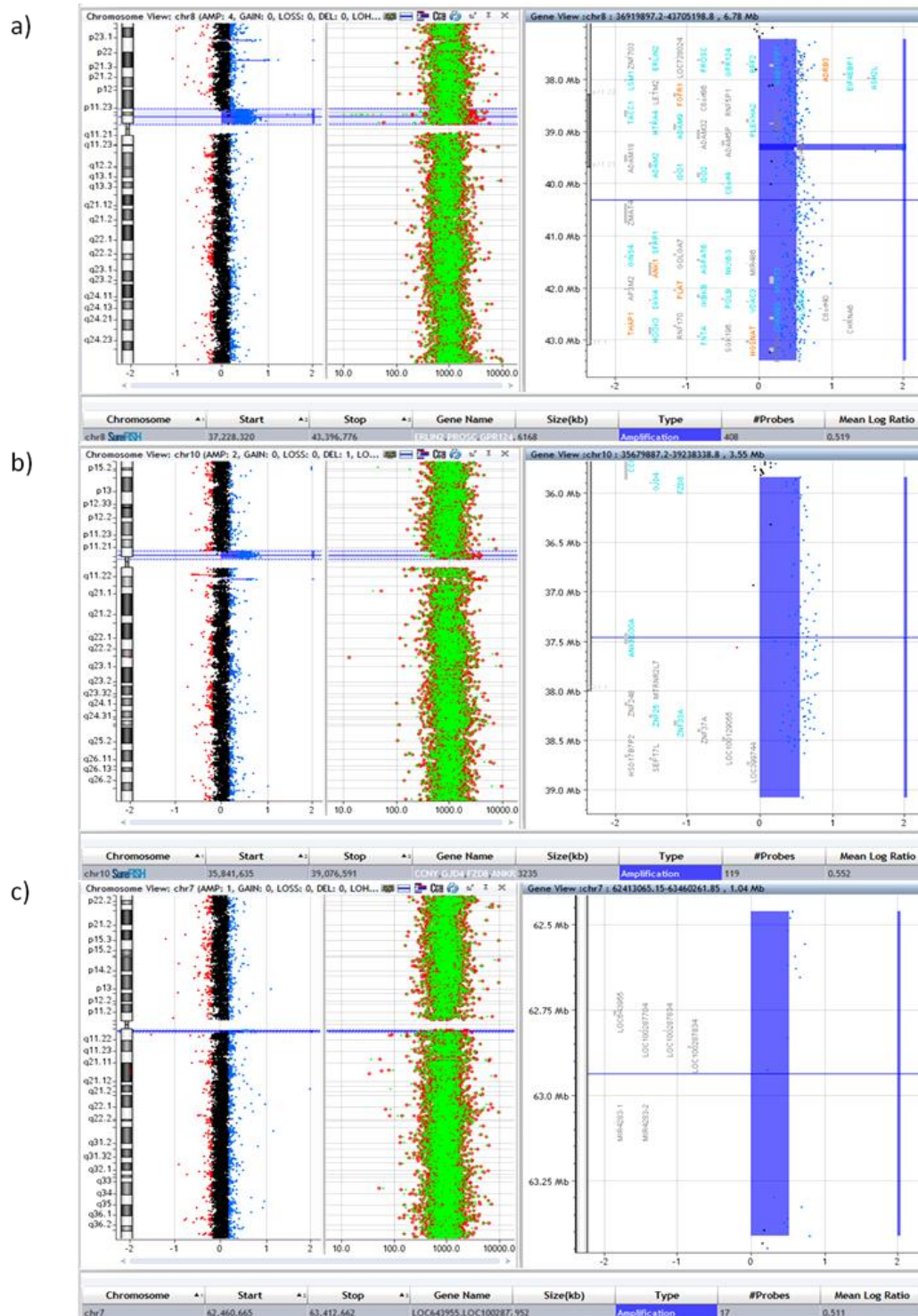


Figura 49 – Resultado do array-CGH no caso 26: a) duplicação na região 8p11.23p11.21; b) duplicação encontrada na região 10p11.21p11.1; c) duplicação encontrada na região 7q11.21.

Tal como foi dito anteriormente, de acordo com o conteúdo génico, as duplicações encontradas nos cromossomas 8 e 10 justificam mais facilmente o fenótipo. Estas alterações não estão presentes na DGV e aparecem descritas no DECIPHER em vários casos de atraso mental, no desenvolvimento, na linguagem e dificuldades de aprendizagem, sendo mais frequente a duplicação no cromossoma 8. A duplicação no cromossoma 7 aparece na DGV e apenas coincide com duas duplicações descritas no DECIPHER. Para além disso, os genes nesta região não estão presentes na base de dados do OMIM.

Neste caso não foi possível o estudo genético dos progenitores, não sendo possível concluir sobre a origem destes cromossomas marcadores. No entanto, pela dimensão e conteúdo génico, conclui-se que o material genético adicional pertencente aos cromossomas 8 e 10 é, muito provavelmente, responsável pelo fenótipo de défice cognitivo desta paciente.

Capítulo V Conclusões

Ao longo deste estudo, foram detetadas CNVs patogénicas ou provavelmente patogénicas em 26 pacientes, entre os 121 com indicações clínicas de atraso mental síndrómico ou não síndrómico e/ou atraso cognitivo. Assim, a taxa de deteção da técnica de *array*-CGH neste conjunto de indivíduos foi de aproximadamente 21.5%. Contudo, são de referir algumas limitações deste procedimento. A existência de CNVs com penetrância incompleta dificulta a interpretação da patogenicidade destas alterações, assim como, está ainda por clarificar o significado clínico de muitas CNVs. Ao longo deste trabalho, foram detetadas várias CNVs que foram classificadas como IIIA, segundo a classificação utilizada no laboratório. Quando pesquisadas em bases de dados como o DECIPHER, estas alterações surgem relacionadas a patologias do foro mental e nervoso, no entanto, os genes por elas envolvidos não estão, muitas das vezes, associados a processos fisiológicos importantes nestes distúrbios. Isto demonstra a necessidade de um estudo aprofundado sobre todas as alterações presentes nos indivíduos com atraso mental e/ou outros sintomas associados. Trabalhos como este são também importantes para a diversificação das populações envolvidas em estudos genéticos de patologias relacionadas com o neurodesenvolvimento.

A taxa de deteção de desequilíbrios cromossómicos por *array*-CGH é superior à das restantes técnicas de citogenética clássica e molecular, como o cariótipo e FISH, o que faz desta técnica o teste de primeira linha a realizar em casos de atraso mental síndrómico ou não síndrómico. Este desenvolvimento faz com que seja possível melhorar o aconselhamento genético aos pacientes e às suas famílias, assim como, permitir uma explicação para a causa da patologia que os afeta, o que se revela muito importante para a compreensão e aceitação da doença. No entanto, é importante ter em conta que existem casos em que é necessária a conjugação de várias técnicas de citogenética, como por exemplo nos casos 9 e 26 em que o cariótipo permitiu a identificação de uma trissomia em mosaico e da existência de três cromossomas marcadores, respetivamente. A técnica de *array*-CGH não permite também a identificação de translocações nem a distinção entre alterações que ocorrem nas regiões pseudoautosómicas dos cromossomas sexuais, como aconteceu nos casos 17 e 23, em que seria necessário a realização de FISH para a determinar em que cromossoma se encontra presente a alteração.

No futuro, é de prever que esta técnica seja substituída por outras com maior resolução ou mais informativas, como a sequenciação de nova geração (NGS), que permite a sequenciação de um painel de genes, do exoma ou de todo o genoma de um indivíduo. A interpretação da grande quantidade de informação que a NGS permite retirar do genoma humano, demonstra-se também um grande desafio e irá necessitar de muita investigação e de novas ferramentas bioinformáticas que permitam concluir acerca de novas variantes do genoma¹⁹⁶.

Capítulo VI Referências Bibliográficas

1. Kharbanda, M., Tolmie, J., and Joss, S. (2014). How to use...microarray comparative genomic hybridisation to investigate developmental disorders. Archives of Disease in Childhood - Education and Practice Published Online.
2. Turnpenny, P.D., and Ellard, S. (2012). Emery's Elements of Medical Genetics.
3. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., and Willard, H.F. (2007). Thompson & Thompson Genetics In Medicine.
4. Smeets, D.F.C.M. (2004). Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. Clinical Biochemistry 37, 439–446.
5. Riegel, M. (2014). Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. Genetics and Molecular Biology 37, 194-209.
6. Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, kern und zelltheilung.(Leipzig, Vogel).
7. Ferguson-Smith, M.A. (2015). History and evolution of cytogenetics. Molecular Cytogenetics 8, 19.
8. Hsu, T.C. (1952). Mammalian chromosomes in vitro: 1. The karyotype of man. The Journal of Heredity 43, 167-172.
9. Tijo, J., and Levan, A. (1956). The chromosome number of man. Hereditas 42, 1-6
10. Lejeune, J., Turpin, R., and Gautier, M. (1959). Chromosomic diagnosis of mongolism. Archives françaises de Pédiatrie 16, 962-963.
11. Ford, C., Jones, K., Polani, P., Almeida, J.D., and Briggs, J. (1959). A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). Lancet 1, 711-713.
12. Strong, P.J.J. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature 183, 302-303.
13. Patau, K., Smith, D.W., Therman, E., Inhorn, S.L., and Wagner, H.P. (1960). Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. Lancet 1, 790-793.
14. Edwards, J.H., Harnden, D.G., Cameron, A.H., Crosse, V.M., and Wolff, O.H. (1960). A new trisomic syndrome. Lancet 1, 787-790.
15. Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.E., Kudynowski, J., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, U., and Zech, L. (1968). Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Experimental cell research 49, 219-222.

16. Caspersson, T., Zech, L., and Johansson, C. (1970). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental cell research* 60, 315-319.
17. Seabright, M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2, 971-972.
18. Sumner, A.T., Evans, H.J., and Buckland, R.A. (1971). New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature: New biology* 232, 31-32.
19. Nowell, P.C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer research* 20, 462-466.
20. Yunis, J.J. (1976). High resolution of human chromosomes. *Science* 191, 1268-1270.
21. Sismani, C., Armour, J.A., Flint, J., Girgalli, C., Regan, R., and Patsalis, P.C. (2001). Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *European journal of human genetics : EJHG* 9, 527-532.
22. Bayani, J., and Squire, J. (2004). Multi-color FISH techniques. *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 22.
23. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.
24. Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., Cremer, T., and Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes and cancer* 20, 399-407.
25. Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.-L., Chen, C., and Zhai, Y. (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature genetics* 20, 207-211.
26. Edelmann, L., and Hirschhorn, K. (2009). Clinical Utility of Array CGH for the Detection of Chromosomal Imbalances Associated with Mental Retardation and Multiple Congenital Anomalies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1151, 157-166.
27. Miller, D.T., Adam, M.P., Aradhya, S., Biesecker, L.G., Brothman, A.R., Carter, N.P., Church, D.M., Crolla, J.A., Eichler, E.E., Epstein, C.J., et al. (2010). Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic

- test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American Journal of Human Genetics* 86, 749–764.
28. Galasso, C., Lo-Castro, A., El-Malhany, N., and Curatolo, P. (2010). “Idiopathic” mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Italian Journal of Pediatrics* 36, 17.
29. Beaudet, A.L. (2013). The Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Developmental and Behavioral Pediatrics. *Child Development* 84, 121–132.
30. Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., Thiruvahindrapuram, B., Xu, X., Ziman, R., Wang, Z., et al. (2014). Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders. *American Journal of Human Genetics* 94, 677-694.
31. Qiao, Y., Mercier, E., Dastan, J., Hurlburt, J., McGillivray, B., Chudley, A.E., Farrell, S., Bernier, F.P., Lewis, M.S., Pavlidis, P., et al. (2014). Copy number variants (CNVs) analysis in a deeply phenotyped cohort of individuals with intellectual disability (ID). *BMC Medical Genetics* 15, 82.
32. Tzetis, M., Kitsiou-Tzeli, S., Frysira, H., Xaidara, A., and Kanavakis, E. (2012). The clinical utility of molecular karyotyping using high-resolution array-comparative genomic hybridization. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 12, 449–457.
33. Puiu, M., Dumitriu, S., Chiriță-Emandi, A., Grădinaru, R., and Arghirescu, S. (2013). The Genetics of Mental Retardation. In *Genetic Disorders*, InTech, ed., pp 143-174.
34. Organização Mundial da Saúde. (2010). Mental and behavioural disorders. In *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10)*. (
35. Pfundt, R., and Veltman, J.A. (2012). Structural Genomic Variation in Intellectual Disability. *Genomic Structural Variants: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology 838, 77-95.
36. Mefford, H.C., Batshaw, M.L., and Hoffman, E.P. (2012). Genomics, Intellectual Disability, and Autism. *The New England Journal of Medicine* 366, 733-743.
37. Kaufman, L., Ayub, M., and Vincent, J.B. (2010). The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of neurodevelopmental disorders* 2, 182-209.
38. Maulik, P.K., Mascarenhas, M.N., Mathers, C.D., Dua, T., and Saxena, S. (2011). Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Research in Developmental Disabilities* 32, 419–436.
39. Ropers, H.H. (2008). Genetics of intellectual disability. *Current opinion in genetics & development* 18, 241-250.

40. Chelly, J., Khelfaoui, M., Francis, F., Chérif, B., and Bienvenu, T. (2006). Genetics and pathophysiology of mental retardation. *European Journal of Human Genetics* 14, 701–713.
41. Ropers, H.H., and Hamel, B.C.J. (2005). X-Linked Mental Retardation. *Nature Reviews Genetics* 6, 46-57.
42. Tzschach, A., and Ropers, H.-H. (2007). Genetics of Mental Retardation. *Dtsch Arztebl* 104, 1400–1405.
43. Nevado, J., Mergener, R., Palomares-Bralo, M., Souza, K.R., Vallespín, E., Mena, R., Martínez-Glez, V., Mori, M.Á., Santos, F., García-Miñaur, S., et al. (2014). New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genetics and Molecular Biology* 37, 210-219.
44. Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shapero, M.H., Carson, A.R., Chen, W., et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444-454.
45. Feuk, L., Carson, A.R., and Scherer, S.W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nature reviews Genetics* 7, 85-97.
46. Xu, F., Li, L., Schulz, V.P., Gallagher, P.G., Xiang, B., Zhao, H., and Li, P. (2014). Cytogenomic mapping and bioinformatic mining reveal interacting brain expressed genes for intellectual disability. *Molecular Cytogenetics* 7, 4.
47. Webber, C., Hehir-Kwa, J.Y., Nguyen, D.-Q., Vries, B.B.A.d., Veltman, J.A., and Ponting, C.P. (2009). Forging Links between Human Mental Retardation–Associated CNVs and Mouse Gene Knockout Models. *PLoS Genetics* 5, e1000531.
48. Conrad, D.F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., Andrews, T.D., Barnes, C., Campbell, P., et al. (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704-712.
49. Arlt, M.F., Wilson, T.E., and Glover, T.W. (2012). Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Current opinion in genetics & development* 22, 204-210.
50. MacDonald, J.R., Ziman, R., Yuen, R.K., Feuk, L., and Scherer, S.W. (2014). The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic acids research* 42, D986-992.
51. Firth, H.V., Richards, S.M., Bevan, A.P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., Van Vooren, S., Moreau, Y., Pettett, R.M., and Carter, N.P. (2009). DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* 84, 524-533.

52. Hamosh, A., Scott, A.F., Amberger, J., Bocchini, C., Valle, D., and McKusick, V.A. (2002). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research* 30, 52-55.
53. Kearney, H.M., Thorland, E.C., Brown, K.K., Quintero-Rivera, F., and South, S.T. (2011). American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 13, 680-685.
54. Sim, J.C., White, S.M., and Lockhart, P.J. (2015). ARID1B-mediated disorders: Mutations and possible mechanisms. *Intractable Rare Dis Res* 4, 17-23.
55. Flores-Alcantar, A., Gonzalez-Sandoval, A., Escalante-Alcalde, D., and Lomeli, H. (2011). Dynamics of expression of ARID1A and ARID1B subunits in mouse embryos and in cells during the cell cycle. *Cell Tissue Res* 345, 137-148.
56. Nagl, N.G., Jr., Wang, X., Patsialou, A., Van Scoy, M., and Moran, E. (2007). Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *EMBO J* 26, 752-763.
57. Schaniel, C., Ang, Y.S., Ratnakumar, K., Cormier, C., James, T., Bernstein, E., Lemischka, I.R., and Paddison, P.J. (2009). Smarcc1/Baf155 couples self-renewal gene repression with changes in chromatin structure in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 2979-2991.
58. Tuoc, T.C., Boretius, S., Sansom, S.N., Pitulescu, M.E., Frahm, J., Livesey, F.J., and Stoykova, A. (2013). Chromatin regulation by BAF170 controls cerebral cortical size and thickness. *Dev Cell* 25, 256-269.
59. Pirola, B., Bortotto, L., Giglio, S., Piovan, E., Janes, A., Guerrini, R., and Zuffardi, O. (1998). Agenesis of the corpus callosum with Probst bundles owing to haploinsufficiency for a gene in an 8 cM region of 6q25. *J Med Genet* 35, 1031-1033.
60. Nagamani, S.C., Erez, A., Eng, C., Ou, Z., Chinault, C., Workman, L., Coldwell, J., Stankiewicz, P., Patel, A., Lupski, J.R., et al. (2009). Interstitial deletion of 6q25.2-q25.3: a novel microdeletion syndrome associated with microcephaly, developmental delay, dysmorphic features and hearing loss. *European journal of human genetics : EJHG* 17, 573-581.
61. Nord, A.S., Roeb, W., Dickel, D.E., Walsh, T., Kusenda, M., O'Connor, K.L., Malhotra, D., McCarthy, S.E., Stray, S.M., Taylor, S.M., et al. (2011). Reduced transcript expression of genes affected by inherited and de novo CNVs in autism. *European journal of human genetics : EJHG* 19, 727-731.

62. Halgren, C., Kjaergaard, S., Bak, M., Hansen, C., El-Schich, Z., Anderson, C.M., Henriksen, K.F., Hjalgrim, H., Kirchhoff, M., Bijlsma, E.K., et al. (2012). Corpus callosum abnormalities, intellectual disability, speech impairment, and autism in patients with haploinsufficiency of ARID1B. *Clin Genet* 82, 248-255.
63. Hoyer, J., Ekici, A.B., Ende, S., Popp, B., Zweier, C., Wiesener, A., Wohlleber, E., Dufke, A., Rossier, E., Petsch, C., et al. (2012). Haploinsufficiency of ARID1B, a member of the SWI/SNF-a chromatin-remodeling complex, is a frequent cause of intellectual disability. *Am J Hum Genet* 90, 565-572.
64. Santen, G.W., Aten, E., Sun, Y., Almomani, R., Gilissen, C., Nielsen, M., Kant, S.G., Snoeck, I.N., Peeters, E.A., Hilhorst-Hofstee, Y., et al. (2012). Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44, 379-380.
65. Tsurusaki, Y., Okamoto, N., Ohashi, H., Kosho, T., Imai, Y., Hibi-Ko, Y., Kaname, T., Naritomi, K., Kawame, H., Wakui, K., et al. (2012). Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44, 376-378.
66. Wieczorek, D., Bogershausen, N., Beleggia, F., Steiner-Haldenstatt, S., Pohl, E., Li, Y., Milz, E., Martin, M., Thiele, H., Altmüller, J., et al. (2013). A comprehensive molecular study on Coffin-Siris and Nicolaides-Baraitser syndromes identifies a broad molecular and clinical spectrum converging on altered chromatin remodeling. *Human molecular genetics* 22, 5121-5135.
67. Sim, J.C., White, S.M., Fitzpatrick, E., Wilson, G.R., Gillies, G., Pope, K., Mountford, H.S., Topping, P.M., McKee, S., Vulto-van Silfhout, A.T., et al. (2014). Expanding the phenotypic spectrum of ARID1B-mediated disorders and identification of altered cell-cycle dynamics due to ARID1B haploinsufficiency. *Orphanet J Rare Dis* 9, 43.
68. Lerer, I., Sagi, M., Meiner, V., Cohen, T., Zlotogora, J., and Abeliovich, D. (2005). Deletion of the ANKRD15 gene at 9p24.3 causes parent-of-origin-dependent inheritance of familial cerebral palsy. *Human molecular genetics* 14, 3911-3920.
69. Vanzo, R.J., Martin, M.M., Sdano, M.R., and South, S.T. (2013). Familial KANK1 deletion that does not follow expected imprinting pattern. *Eur J Med Genet* 56, 256-259.
70. Cafferkey, M., Ahn, J.W., Flinter, F., and Ogilvie, C. (2014). Phenotypic features in patients with 15q11.2(BP1-BP2) deletion: further delineation of an emerging syndrome. *Am J Med Genet A* 164A, 1916-1922.
71. Cox, D.M., and Butler, M.G. (2015). The 15q11.2 BP1-BP2 microdeletion syndrome: a review. *Int J Mol Sci* 16, 4068-4082.

72. Murphy, S.M., Preble, A.M., Patel, U.K., O'Connell, K.L., Dias, D.P., Moritz, M., Agard, D., Stults, J.T., and Stearns, T. (2001). GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell* 12, 3340-3352.
73. Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., and Mandel, J.L. (2001). A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8844-8849.
74. Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kubomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1998). p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem* 273, 291-295.
75. Tsang, H.T., Edwards, T.L., Wang, X., Connell, J.W., Davies, R.J., Durrington, H.J., O'Kane, C.J., Luzio, J.P., and Reid, E. (2009). The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Human molecular genetics* 18, 3805-3821.
76. Goytain, A., Hines, R.M., and Quamme, G.A. (2008). Functional characterization of NIPA2, a selective Mg²⁺ transporter. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C944-953.
77. Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., and Ohara, O. (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 5, 355-364.
78. Li, S., Satoh, H., Watanabe, T., Nakamura, S., and Hattori, S. (1996). cDNA cloning and chromosomal mapping of a novel human GAP (GAP1M), a GTPase-activating protein of Ras. *Genomics* 35, 625-627.
79. Mefford, H.C., Clauin, S., Sharp, A.J., Moller, R.S., Ullmann, R., Kapur, R., Pinkel, D., Cooper, G.M., Ventura, M., Ropers, H.H., et al. (2007). Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am J Hum Genet* 81, 1057-1069.
80. Nagamani, S.C., Erez, A., Shen, J., Li, C., Roeder, E., Cox, S., Karaviti, L., Pearson, M., Kang, S.H., Sahoo, T., et al. (2010). Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12. *European journal of human genetics : EJHG* 18, 278-284.
81. Bertini, V., Orsini, A., Bonuccelli, A., Cambi, F., Del Pistoia, M., Vannozzi, I., Toschi, B., Saggese, G., Simi, P., and Valetto, A. (2015). 17q12 microduplications: a challenge for clinicians. *Am J Med Genet A* 167A, 674-676.

82. Zhao, Y., Kwan, K.M., Mailloux, C.M., Lee, W.K., Grinberg, A., Wurst, W., Behringer, R.R., and Westphal, H. (2007). LIM-homeodomain proteins Lhx1 and Lhx5, and their cofactor Ldb1, control Purkinje cell differentiation in the developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13182-13186.
83. Kania, A., Johnson, R.L., and Jessell, T.M. (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell* 102, 161-173.
84. Roberts, J.L., Gandomi, S.K., Parra, M., Lu, I., Gau, C.L., Dasouki, M., and Butler, M.G. (2014). Clinical report of a 17q12 microdeletion with additionally unreported clinical features. *Case Rep Genet* 2014, 264947.
85. Palumbo, P., Antona, V., Palumbo, O., Piccione, M., Nardello, R., Fontana, A., Carella, M., and Corsello, G. (2014). Variable phenotype in 17q12 microdeletions: clinical and molecular characterization of a new case. *Gene* 538, 373-378.
86. Li, R., Fu, F., Zhang, Y.L., Li, D.Z., and Liao, C. (2014). Prenatal diagnosis of 17q12 duplication and deletion syndrome in two fetuses with congenital anomalies. *Taiwan J Obstet Gynecol* 53, 579-582.
87. Laffargue, F., Bourthoumieu, S., Llanas, B., Baudouin, V., Lahoche, A., Morin, D., Bessenay, L., De Parscau, L., Cloarec, S., Delrue, M.A., et al. (2015). Towards a new point of view on the phenotype of patients with a 17q12 microdeletion syndrome. *Arch Dis Child* 100, 259-264.
88. Moreno-De-Luca, D., Mulle, J.G., Kaminsky, E.B., Sanders, S.J., Myers, S.M., Adam, M.P., Pakula, A.T., Eisenhauer, N.J., Uhas, K., Weik, L., et al. (2010). Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 87, 618-630.
89. Rump, P., Dijkhuizen, T., Sikkema-Raddatz, B., Lemmink, H.H., Vos, Y.J., Verheij, J.B., and van Ravenswaaij, C.M. (2008). Drayer's syndrome of mental retardation, microcephaly, short stature and absent phalanges is caused by a recurrent deletion of chromosome 15(q26.2-->qter). *Clin Genet* 74, 455-462.
90. Tonnies, H., Schulze, I., Hennies, H., Neumann, L.M., Keitzer, R., and Neitzel, H. (2001). De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes. *J Med Genet* 38, 617-621.
91. Walenkamp, M.J., de Muinck Keizer-Schrama, S.M., de Mos, M., Kalf, M.E., van Duyvenvoorde, H.A., Boot, A.M., Kant, S.G., White, S.J., Losekoot, M., Den Dunnen, J.T., et al. (2008). Successful long-term growth hormone therapy in a girl with haploinsufficiency of the insulin-like growth factor-I receptor due to a

- terminal 15q26.2->qter deletion detected by multiplex ligation probe amplification. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 2421-2425.
92. Veenma, D.C., Eussen, H.J., Govaerts, L.C., de Kort, S.W., Odink, R.J., Wouters, C.H., Hokken-Koelega, A.C., and de Klein, A. (2010). Phenotype-genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case. *J Med Genet* 47, 492-498.
93. Girirajan, S., Dennis, M.Y., Baker, C., Malig, M., Coe, B.P., Campbell, C.D., Mark, K., Vu, T.H., Alkan, C., Cheng, Z., et al. (2013). Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 92, 221-237.
94. Kanduri, C., Kantojarvi, K., Salo, P.M., Vanhala, R., Buck, G., Blancher, C., Lahdesmaki, H., and Jarvela, I. (2015). The landscape of copy number variations in Finnish families with autism spectrum disorders. *Autism Res*.
95. Ozgen, H.M., van Daalen, E., Bolton, P.F., Maloney, V.K., Huang, S., Cresswell, L., van den Boogaard, M.J., Eleveld, M.J., van 't Slot, R., Hochstenbach, R., et al. (2009). Copy number changes of the microcephalin 1 gene (MCPH1) in patients with autism spectrum disorders. *Clin Genet* 76, 348-356.
96. Giglio, S., Broman, K.W., Matsumoto, N., Calvari, V., Gimelli, G., Neumann, T., Ohashi, H., Voullaire, L., Larizza, D., Giorda, R., et al. (2001). Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 68, 874-883.
97. Jackson, A.P., Eastwood, H., Bell, S.M., Adu, J., Toomes, C., Carr, I.M., Roberts, E., Hampshire, D.J., Crow, Y.J., Mighell, A.J., et al. (2002). Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am J Hum Genet* 71, 136-142.
98. Lin, S.Y., Rai, R., Li, K., Xu, Z.X., and Elledge, S.J. (2005). BRIT1/MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15105-15109.
99. Fisch, G.S. (2015). Cognitive-behavioral characteristics and developmental trajectories in children with deletion 11qter (Jacobsen syndrome), and their relation to deletion size. *Am J Med Genet A* 167A, 45-53.
100. Liu, Y.F., Sowell, S.M., Luo, Y., Chaubey, A., Cameron, R.S., Kim, H.G., and Srivastava, A.K. (2015). Autism and Intellectual Disability-Associated KIRREL3 Interacts with Neuronal Proteins MAP1B and MYO16 with Potential Roles in Neurodevelopment. *PLoS One* 10, e0123106.
101. Hacıhamdioglu, B., Hacıhamdioglu, D., and Delil, K. (2015). 22q11 deletion syndrome: current perspective. *Appl Clin Genet* 8, 123-132.

102. Kobrynski, L.J., and Sullivan, K.E. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet* 370, 1443-1452.
103. Emanuel, B.S. (2008). Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev* 14, 11-18.
104. Gao, S., Li, X., and Amendt, B.A. (2013). Understanding the role of Tbx1 as a candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep* 13, 613-621.
105. Raux, G., Bumsel, E., Hecketsweiler, B., van Amelsvoort, T., Zinkstok, J., Manouvrier-Hanu, S., Fantini, C., Breviere, G.M., Di Rosa, G., Pustorino, G., et al. (2007). Involvement of hyperprolinemia in cognitive and psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome. *Human molecular genetics* 16, 83-91.
106. Tsai, M.C., Cheng, H.Y., Su, M.T., Chen, M., and Kuo, P.L. (2014). Partial trisomy 8 mosaicism not detected by cultured amniotic-fluid cells. *Taiwan J Obstet Gynecol* 53, 598-601.
107. Berry, A.C., Mutton, D.E., and Lewis, D.G. (1978). Mosaicism and the trisomy 8 syndrome. *Clin Genet* 14, 105-114.
108. Fineman, R.M., Ablow, R.C., Howard, R.O., Albright, J., and Breg, W.R. (1975). Trisomy 8 mosaicism syndrome. *Pediatrics* 56, 762-767.
109. Danesino, C., Pasquali, F., Dellavecchia, C., Maserati, E., Minelli, A., and Seghezzi, L. (1998). Constitutional trisomy 8 mosaicism: mechanism of origin, phenotype variability, and risk of malignancies. *American journal of medical genetics* 80, 540.
110. Chen, C.P., Su, Y.N., Chern, S.R., Chen, Y.T., Su, J.W., Pan, C.W., and Wang, W. (2012). Prenatal diagnosis of trisomy 8 mosaicism. *Taiwan J Obstet Gynecol* 51, 666-668.
111. Monani, U., and Burghes, A.H. (1996). Structure of the human alpha 2 subunit gene of the glycine receptor--use of vectorette and Alu-exon PCR. *Genome Res* 6, 1200-1206.
112. Avila, A., Vidal, P.M., Dear, T.N., Harvey, R.J., Rigo, J.M., and Nguyen, L. (2013). Glycine receptor alpha2 subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep* 4, 738-750.
113. Mefford, H.C., Sharp, A.J., Baker, C., Itsara, A., Jiang, Z., Buysse, K., Huang, S., Maloney, V.K., Crolla, J.A., Baralle, D., et al. (2008). Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 359, 1685-1699.

114. Brunetti-Pierri, N., Berg, J.S., Scaglia, F., Belmont, J., Bacino, C.A., Sahoo, T., Lalani, S.R., Graham, B., Lee, B., Shinawi, M., et al. (2008). Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet* 40, 1466-1471.
115. Bernier, R., Steinman, K.J., Reilly, B., Wallace, A.S., Sherr, E.H., Pojman, N., Mefford, H.C., Gerdts, J., Earl, R., Hanson, E., et al. (2015). Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*.
116. Basel-Vanagaite, L., Goldberg-Stern, H., Mimouni-Bloch, A., Shkalim, V., Bohm, D., and Kohlhase, J. (2011). An emerging 1q21.1 deletion-associated neurodevelopmental phenotype. *J Child Neurol* 26, 113-116.
117. Harvard, C., Strong, E., Mercier, E., Colnaghi, R., Alcantara, D., Chow, E., Martell, S., Tyson, C., Hrynychak, M., McGillivray, B., et al. (2011). Understanding the impact of 1q21.1 copy number variant. *Orphanet J Rare Dis* 6, 54.
118. Battaglia, A., Novelli, A., Bernardini, L., Igliozzi, R., and Parrini, B. (2009). Further characterization of the new microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Am J Med Genet A* 149A, 1200-1204.
119. Shinawi, M., Liu, P., Kang, S.H., Shen, J., Belmont, J.W., Scott, D.A., Probst, F.J., Craigen, W.J., Graham, B.H., Pursley, A., et al. (2010). Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 47, 332-341.
120. Beunders, G., Voorhoeve, E., Golzio, C., Pardo, L.M., Rosenfeld, J.A., Talkowski, M.E., Simonic, I., Lionel, A.C., Vergult, S., Pyatt, R.E., et al. (2013). Exonic deletions in *AUTS2* cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet* 92, 210-220.
121. Amarillo, I.E., Li, W.L., Li, X., Vilain, E., and Kantarci, S. (2014). De novo single exon deletion of *AUTS2* in a patient with speech and language disorder: a review of disrupted *AUTS2* and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *Am J Med Genet A* 164A, 958-965.
122. Girirajan, S., Brkanac, Z., Coe, B.P., Baker, C., Vives, L., Vu, T.H., Shafer, N., Bernier, R., Ferrero, G.B., Silengo, M., et al. (2011). Relative Burden of Large CNVs on a Range of Neurodevelopmental Phenotypes. *PLoS Genet* 7.
123. Brody, M.J., Cho, E., Mysliwiec, M.R., Kim, T.G., Carlson, C.D., Lee, K.H., and Lee, Y. (2013). *Lrrc10* is a novel cardiac-specific target gene of *Nkx2-5* and *GATA4*. *J Mol Cell Cardiol* 62, 237-246.

124. Salemi, M., Calogero, A.E., Vicari, E., Migliore, E., Zaccarelli, G., Cosentino, A., Amore, M., Tricoli, D., Castiglione, R., Bosco, P., et al. (2009). A high percentage of skin melanoma cells expresses SPANX proteins. *Am J Dermatopathol* 31, 182-186.
125. South, S.T., Rope, A.F., Lamb, A.N., Aston, E., Glaus, N., Whitby, H., Maxwell, T., Zhu, X.L., and Brothman, A.R. (2008). Expansion in size of a terminal deletion: a paradigm shift for parental follow-up studies. *J Med Genet* 45, 391-395.
126. Shaw, C.J., Bi, W., and Lupski, J.R. (2002). Genetic proof of unequal meiotic crossovers in reciprocal deletion and duplication of 17p11.2. *Am J Hum Genet* 71, 1072-1081.
127. Jefferies, J.L., Pignatelli, R.H., Martinez, H.R., Robbins-Furman, P.J., Liu, P., Gu, W., Lupski, J.R., and Potocki, L. (2012). Cardiovascular findings in duplication 17p11.2 syndrome. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 14, 90-94.
128. Potocki, L., Chen, K.S., Park, S.S., Osterholm, D.E., Withers, M.A., Kimonis, V., Summers, A.M., Meschino, W.S., Anyane-Yeboah, K., Kashork, C.D., et al. (2000). Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 24, 84-87.
129. Potocki, L., Bi, W., Treadwell-Deering, D., Carvalho, C.M., Eifert, A., Friedman, E.M., Glaze, D., Krull, K., Lee, J.A., Lewis, R.A., et al. (2007). Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet* 80, 633-649.
130. Soler-Alfonso, C., Motil, K.J., Turk, C.L., Robbins-Furman, P., Friedman, E.M., Zhang, F., Lupski, J.R., Fraley, J.K., and Potocki, L. (2011). Potocki-Lupski syndrome: a microduplication syndrome associated with oropharyngeal dysphagia and failure to thrive. *J Pediatr* 158, 655-659 e652.
131. Yusupov, R., Roberts, A.E., Lacro, R.V., Sandstrom, M., and Ligon, A.H. (2011). Potocki-Lupski syndrome: an inherited dup(17)(p11.2p11.2) with hypoplastic left heart. *Am J Med Genet A* 155A, 367-371.
132. Sanchez-Valle, A., Pierpont, M.E., and Potocki, L. (2011). The severe end of the spectrum: Hypoplastic left heart in Potocki-Lupski syndrome. *Am J Med Genet A* 155A, 363-366.
133. Zhang, F., Potocki, L., Sampson, J.B., Liu, P., Sanchez-Valle, A., Robbins-Furman, P., Navarro, A.D., Wheeler, P.G., Spence, J.E., Brasington, C.K., et al. (2010). Identification of uncommon recurrent Potocki-Lupski syndrome-

- associated duplications and the distribution of rearrangement types and mechanisms in PTLs. *Am J Hum Genet* 86, 462-470.
134. Walz, K., Paylor, R., Yan, J., Bi, W., and Lupski, J.R. (2006). Rai1 duplication causes physical and behavioral phenotypes in a mouse model of dup(17)(p11.2p11.2). *J Clin Invest* 116, 3035-3041.
135. Ndika, J.D., Lusink, V., Beaubrun, C., Kanhai, W., Martinez-Munoz, C., Jakobs, C., and Salomons, G.S. (2014). Cloning and characterization of the promoter regions from the parent and paralogous creatine transporter genes. *Gene* 533, 488-493.
136. Ramocki, M.B., Bartnik, M., Szafranski, P., Kolodziejska, K.E., Xia, Z., Bravo, J., Miller, G.S., Rodriguez, D.L., Williams, C.A., Bader, P.I., et al. (2010). Recurrent distal 7q11.23 deletion including HIP1 and YWHAG identified in patients with intellectual disabilities, epilepsy, and neurobehavioral problems. *Am J Hum Genet* 87, 857-865.
137. Stock, A.D., Spallone, P.A., Dennis, T.R., Netski, D., Morris, C.A., Mervis, C.B., and Hobart, H.H. (2003). Heat shock protein 27 gene: chromosomal and molecular location and relationship to Williams syndrome. *Am J Med Genet A* 120A, 320-325.
138. Isrie, M., Esteki, M.Z., Peeters, H., Voet, T., Van Houdt, J., Van Paesschen, W., and Van Esch, H. (2015). Homozygous missense mutation in STYXL1 associated with moderate intellectual disability, epilepsy and behavioural complexities. *Eur J Med Genet* 58, 205-210.
139. Porter, M.A., Dobson-Stone, C., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Beckett, W., and Tassabehji, M. (2012). A role for transcription factor GTF2IRD2 in executive function in Williams-Beuren syndrome. *PLoS One* 7, e47457.
140. Maeda, H., Nagata, S., Wolfgang, C.D., Bratthauer, G.L., Bera, T.K., and Pastan, I. (2004). The T cell receptor gamma chain alternate reading frame protein (TARP), a prostate-specific protein localized in mitochondria. *J Biol Chem* 279, 24561-24568.
141. Geserick, P., Kaiser, F., Klemm, U., Kaufmann, S.H., and Zerrahn, J. (2004). Modulation of T cell development and activation by novel members of the Schlafen (slfn) gene family harbouring an RNA helicase-like motif. *Int Immunol* 16, 1535-1548.
142. Mervis, C.B., Klein-Tasman, B.P., Huffman, M.J., Velleman, S.L., Pitts, C.H., Henderson, D.R., Woodruff-Borden, J., Morris, C.A., and Osborne, L.R. (2015). Children with 7q11.23 duplication syndrome: Psychological characteristics. *Am J Med Genet A* 167, 1436-1450.

143. Van der Aa, N., Rooms, L., Vandeweyer, G., van den Ende, J., Reyniers, E., Fichera, M., Romano, C., Delle Chiaie, B., Mortier, G., Menten, B., et al. (2009). Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet* 52, 94-100.
144. Mervis, C.B., Dida, J., Lam, E., Crawford-Zelli, N.A., Young, E.J., Henderson, D.R., Onay, T., Morris, C.A., Woodruff-Borden, J., Yeomans, J., et al. (2012). Duplication of GTF2I results in separation anxiety in mice and humans. *Am J Hum Genet* 90, 1064-1070.
145. Malenfant, P., Liu, X., Hudson, M.L., Qiao, Y., Hrynychak, M., Riendeau, N., Hildebrand, M.J., Cohen, I.L., Chudley, A.E., Forster-Gibson, C., et al. (2012). Association of GTF2i in the Williams-Beuren syndrome critical region with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 42, 1459-1469.
146. Alangari, A., Alsultan, A., Adly, N., Massaad, M.J., Kiani, I.S., Aljebreen, A., Raddaoui, E., Almomen, A.K., Al-Muhsen, S., Geha, R.S., et al. (2012). LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 130, 481-488 e482.
147. Perrone, M.D., Rocca, M.S., Bruno, I., Faletra, F., Pecile, V., and Gasparini, P. (2012). De novo 911 Kb interstitial deletion on chromosome 1q43 in a boy with mental retardation and short stature. *Eur J Med Genet* 55, 117-119.
148. Petersen, A.K., Ahmad, A., Shafiq, M., Brown-Kipphut, B., Fong, C.T., and Anwar Iqbal, M. (2013). Deletion 1q43 encompassing only CHRM3 in a patient with autistic disorder. *Eur J Med Genet* 56, 118-122.
149. Hamdan, F.F., Srour, M., Capo-Chichi, J.M., Daoud, H., Nassif, C., Patry, L., Massicotte, C., Ambalavanan, A., Spiegelman, D., Diallo, O., et al. (2014). De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS Genet* 10, e1004772.
150. Helena Mangs, A., and Morris, B.J. (2007). The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Curr Genomics* 8, 129-136.
151. Mensah, M.A., Hestand, M.S., Larmuseau, M.H., Isrie, M., Vanderheyden, N., Declercq, M., Souche, E.L., Van Houdt, J., Stoeva, R., Van Esch, H., et al. (2014). Pseudoautosomal region 1 length polymorphism in the human population. *PLoS Genet* 10, e1004578.
152. Ghezzi, D., Saada, A., D'Adamo, P., Fernandez-Vizarra, E., Gasparini, P., Tiranti, V., Elpeleg, O., and Zeviani, M. (2008). FASTKD2 nonsense mutation in an infantile mitochondrial encephalomyopathy associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 83, 415-423.

153. Vuillaume, M.L., Naudion, S., Banneau, G., Diene, G., Cartault, A., Cailley, D., Bouron, J., Toutain, J., Bourrouillou, G., Vigouroux, A., et al. (2014). New candidate loci identified by array-CGH in a cohort of 100 children presenting with syndromic obesity. *Am J Med Genet A* 164A, 1965-1975.
154. Szemes, M., Gyorgy, A., Paweletz, C., Dobi, A., and Agoston, D.V. (2006). Isolation and characterization of SATB2, a novel AT-rich DNA binding protein expressed in development- and cell-specific manner in the rat brain. *Neurochem Res* 31, 237-246.
155. Lieden, A., Kvarnung, M., Nilsson, D., Sahlin, E., and Lundberg, E.S. (2014). Intragenic duplication-a novel causative mechanism for SATB2-associated syndrome. *Am J Med Genet A* 164A, 3083-3087.
156. Leoyklang, P., Suphapeetiporn, K., Srichomthong, C., Tongkobpetch, S., Fietze, S., Dorward, H., Cullinane, A.R., Gahl, W.A., Huizing, M., and Shotelersuk, V. (2013). Disorders with similar clinical phenotypes reveal underlying genetic interaction: SATB2 acts as an activator of the UPF3B gene. *Hum Genet* 132, 1383-1393.
157. Vulto-van Silfhout, A.T., Hehir-Kwa, J.Y., van Bon, B.W., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., Meader, S., Hellebrekers, C.J., Thoonen, I.J., de Brouwer, A.P., Brunner, H.G., Webber, C., et al. (2013). Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation. *Hum Mutat* 34, 1679-1687.
158. Glessner, J.T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C.E., Wood, S., Zhang, H., Estes, A., Brune, C.W., Bradfield, J.P., et al. (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 459, 569-573.
159. Lesch, K.P., Timmesfeld, N., Renner, T.J., Halperin, R., Roser, C., Nguyen, T.T., Craig, D.W., Romanos, J., Heine, M., Meyer, J., et al. (2008). Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm* 115, 1573-1585.
160. Vrijenhoek, T., Buizer-Voskamp, J.E., van der Stelt, I., Strengman, E., Sabatti, C., Geurts van Kessel, A., Brunner, H.G., Ophoff, R.A., and Veltman, J.A. (2008). Recurrent CNVs disrupt three candidate genes in schizophrenia patients. *Am J Hum Genet* 83, 504-510.
161. Wilson, P.M., Fryer, R.H., Fang, Y., and Hatten, M.E. (2010). *Astn2*, a novel member of the astrotactin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration. *J Neurosci* 30, 8529-8540.
162. Girirajan, S., Williams, S., Garbern, J., Nowak, N., Hatchwell, E., and Elsea, S. (2007). 17p11.2p12 triplication and del(17)q11.2q12 in a severely affected child with dup(17)p11.2p12 syndrome. *Clin Genet* 72, 47-58.

163. Ullmann, R., Turner, G., Kirchhoff, M., Chen, W., Tonge, B., Rosenberg, C., Field, M., Vianna-Morgante, A.M., Christie, L., Krepischi-Santos, A.C., et al. (2007). Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* 28, 674-682.
164. Hannes, F.D., Sharp, A.J., Mefford, H.C., de Ravel, T., Ruivenkamp, C.A., Breuning, M.H., Fryns, J.P., Devriendt, K., Van Buggenhout, G., Vogels, A., et al. (2009). Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet* 46, 223-232.
165. Tropeano, M., Ahn, J.W., Dobson, R.J., Breen, G., Rucker, J., Dixit, A., Pal, D.K., McGuffin, P., Farmer, A., White, P.S., et al. (2013). Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One* 8, e61365.
166. Bakircioglu, M., Carvalho, O.P., Khurshid, M., Cox, J.J., Tuysuz, B., Barak, T., Yilmaz, S., Caglayan, O., Dincer, A., Nicholas, A.K., et al. (2011). The essential role of centrosomal NDE1 in human cerebral cortex neurogenesis. *Am J Hum Genet* 88, 523-535.
167. Kuang, S.Q., Guo, D.C., Prakash, S.K., McDonald, M.L., Johnson, R.J., Wang, M., Regalado, E.S., Russell, L., Cao, J.M., Kwartler, C., et al. (2011). Recurrent chromosome 16p13.1 duplications are a risk factor for aortic dissections. *PLoS Genet* 7, e1002118.
168. Bergen, A.A., Plomp, A.S., Schuurman, E.J., Terry, S., Breuning, M., Dauwerse, H., Swart, J., Kool, M., van Soest, S., Baas, F., et al. (2000). Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25, 228-231.
169. Bhalla, K., Phillips, H.A., Crawford, J., McKenzie, O.L., Mulley, J.C., Eyre, H., Gardner, A.E., Kremmidiotis, G., and Callen, D.F. (2004). The de novo chromosome 16 translocations of two patients with abnormal phenotypes (mental retardation and epilepsy) disrupt the A2BP1 gene. *J Hum Genet* 49, 308-311.
170. Martin, C.L., Duvall, J.A., Ilkin, Y., Simon, J.S., Arreaza, M.G., Wilkes, K., Alvarez-Retuerto, A., Whichello, A., Powell, C.M., Rao, K., et al. (2007). Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B, 869-876.
171. Davis, L.K., Maltman, N., Mosconi, M.W., Macmillan, C., Schmitt, L., Moore, K., Francis, S.M., Jacob, S., Sweeney, J.A., and Cook, E.H. (2012). Rare inherited A2BP1 deletion in a proband with autism and developmental hemiparesis. *Am J Med Genet A* 158A, 1654-1661.

172. Lal, D., Reinthaler, E.M., Altmuller, J., Tolia, M.R., Thiele, H., Nurnberg, P., Lerche, H., Hahn, A., Moller, R.S., Muhle, H., et al. (2013). RBFOX1 and RBFOX3 mutations in rolandic epilepsy. *PLoS One* 8, e73323.
173. Lal, D., Trucks, H., Moller, R.S., Hjalgrim, H., Koeleman, B.P., de Kovel, C.G., Visscher, F., Weber, Y.G., Lerche, H., Becker, F., et al. (2013). Rare exonic deletions of the RBFOX1 gene increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 54, 265-271.
174. Zhao, W.W. (2013). Intragenic deletion of RBFOX1 associated with neurodevelopmental/neuropsychiatric disorders and possibly other clinical presentations. *Mol Cytogenet* 6, 26.
175. Auweter, S.D., Fasan, R., Raymond, L., Underwood, J.G., Black, D.L., Pitsch, S., and Allain, F.H. (2006). Molecular basis of RNA recognition by the human alternative splicing factor Fox-1. *EMBO J* 25, 163-173.
176. Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K., and Inoue, K. (2003). A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J* 22, 905-912.
177. Underwood, J.G., Boutz, P.L., Dougherty, J.D., Stoilov, P., and Black, D.L. (2005). Homologues of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals. *Mol Cell Biol* 25, 10005-10016.
178. Nakahata, S., and Kawamoto, S. (2005). Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic acids research* 33, 2078-2089.
179. Kiehl, T.R., Shibata, H., Vo, T., Huynh, D.P., and Pulst, S.M. (2001). Identification and expression of a mouse ortholog of A2BP1. *Mamm Genome* 12, 595-601.
180. Gerber, D.J., Hall, D., Miyakawa, T., Demars, S., Gogos, J.A., Karayiorgou, M., and Tonegawa, S. (2003). Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8993-8998.
181. Talarowska, M., Szemraj, J., Zajackowska, M., and Galecki, P. (2014). ASMT gene expression correlates with cognitive impairment in patients with recurrent depressive disorder. *Med Sci Monit* 20, 905-912.
182. Zawilska, J.B., Skene, D.J., and Arendt, J. (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 61, 383-410.
183. Veatch, O.J., Pendergast, J.S., Allen, M.J., Leu, R.M., Johnson, C.H., Elsea, S.H., and Malow, B.A. (2015). Genetic variation in melatonin pathway enzymes in children with autism spectrum disorder and comorbid sleep onset delay. *J Autism Dev Disord* 45, 100-110.

184. Jonsson, L., Anckarsater, H., Zettergren, A., Westberg, L., Walum, H., Lundstrom, S., Larsson, H., Lichtenstein, P., and Melke, J. (2014). Association between ASMT and autistic-like traits in children from a Swedish nationwide cohort. *Psychiatr Genet* 24, 21-27.
185. Lee, J., Park, H.S., Kim, H.H., Yun, Y.J., Lee, D.R., and Lee, S. (2009). Functional polymorphism in H2BFWT-5'UTR is associated with susceptibility to male infertility. *J Cell Mol Med* 13, 1942-1951.
186. Ying, H.Q., Scott, M.B., and Zhou-Cun, A. (2012). Relationship of SNP of H2BFWT gene to male infertility in a Chinese population with idiopathic spermatogenesis impairment. *Biomarkers* 17, 402-406.
187. Leegwater, P.A., Yuan, B.Q., van der Steen, J., Mulders, J., Konst, A.A., Boor, P.K., Mejaski-Bosnjak, V., van der Maarel, S.M., Frants, R.R., Oudejans, C.B., et al. (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet* 68, 831-838.
188. Lopez-Hernandez, T., Ridder, M.C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V., et al. (2011). Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am J Hum Genet* 88, 422-432.
189. Wang, J., Shang, J., Wu, Y., Gu, Q., Xiong, H., Ding, C., Wang, L., Gao, Z., Wu, X., and Jiang, Y. (2011). Identification of novel MLC1 mutations in Chinese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). *J Hum Genet* 56, 138-142.
190. Bartholdi, D., Stray-Pedersen, A., Azzarello-Burri, S., Kibaek, M., Kirchhoff, M., Oneda, B., Rodningen, O., Schmitt-Mechelke, T., Rauch, A., and Kjaergaard, S. (2014). A newly recognized 13q12.3 microdeletion syndrome characterized by intellectual disability, microcephaly, and eczema/atopic dermatitis encompassing the HMGB1 and KATNAL1 genes. *Am J Med Genet A* 164A, 1277-1283.
191. Sharp, D.J., and Ross, J.L. (2012). Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci* 125, 2561-2569.
192. Bianchi, M.E., and Beltrame, M. (1998). Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am J Hum Genet* 63, 1573-1577.
193. Fang, P., Schachner, M., and Shen, Y.Q. (2012). HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Mol Neurobiol* 45, 499-506.

194. Crolla, J.A., Howard, P., Mitchell, C., Long, F.L., and Dennis, N.R. (1997). A molecular and FISH approach to determining karyotype and phenotype correlations in six patients with supernumerary marker(22) chromosomes. *American journal of medical genetics* 72, 440-447.
195. Vundinti, B.R., Korgaonkar, S., and Ghosh, K. (2012). De novo origin of multiple small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) in a child with intellectual disability and dysmorphic features. *Gene* 498, 128-130.
196. Rehm, H.L., Bale, S.J., Bayrak-Toydemir, P., Berg, J.S., Brown, K.K., Deignan, J.L., Friez, M.J., Funke, B.H., Hegde, M.R., and Lyon, E. (2013). ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 15, 733-747.

Anexos

Anexo 1:

Protocolo de extração de DNA a partir de sangue periférico – CITOGENE (Citomed)

1. Centrifugar o sangue total durante 5 minutos a 2000 rpm.
2. Retirar o *buffy coat* e plasma até 2mL e adicionar a um tubo contendo 6 mL de **RBC Lysis**. Inverter e deixar incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
3. Centrifugar durante 5 minutos a 2000g. Rejeitar o sobrenadante (obtem-se um *pellet* de glóbulos brancos e cerca de 100µL de líquido residual). Agitar no *vortex* até ressuspensão dos glóbulos brancos.
4. Adicionar 2mL de **Cell Lysis** às células e ressuspender no *vortex* (para lise dos glóbulos brancos).
5. Adicionar 666µL de solução **Protein Precipitation** ao lisado celular. Agitar no *vortex* durante cerca de 30 segundos e centrifugar durante 5 minutos a 2000g.
6. Decantar o sobrenadante para um novo tubo de 15mL, contendo 2mL de **2-propanol** (isopropanol) a 100%. Misturar a amostra invertendo cuidadosamente até obtenção de um *pellet* branco (“medusa” de DNA).
7. Transferir o *pellet* de DNA para um tubo de 1.5 novo e estéril (tubo próprio para armazenamento de DNA) contendo 0.5mL de **etanol 70%**, com o auxílio da pipeta de 1000µL.
8. Centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm, numa mini-centrífuga apropriada.
9. Rejeitar o sobrenadante, inverter e escorrer o tubo em papel absorvente e deixar secar ao ar durante cerca de 10 minutos.
10. Adicionar 100µL de **DNA Hydration** e ressuspender o *pellet* por agitação breve no *vortex*.
11. Incubar a amostra durante a noite à temperatura ambiente.
12. Armazenar a 4°C.

Anexo 2:

Protocolo de extração de DNA a partir de sangue periférico – *Prepito DNA Blood250 kit* (Chemagen)

1. Ligar o *Chemagic Prepito* e esperar que o teste termine.
2. Pressionar **[Change Protocol]**.
3. Pressionar **[Blood]** na janela “*Select Protocol Group*”.
4. Selecionar o protocolo **Prepito DNA Blood250 100** e confirmar pressionando **[OK]**.
5. Confirmar a seleção do protocolo na janela “*Select Protocol Group*” pressionando **[OK]**.
6. Inserir o código de acesso de 4 dígitos **[1758]** para autorização e confirmar pressionando em **[Enter]**.
7. Pressionar **[Start Process]**.
8. Ler a informação do protocolo na informação do ecrã e confirmar pressionando **[Continue]**.
9. Selecionar as posições das amostras e confirmar pressionando **[OK]**.
10. Inserir o código de barras do *kit* utilizando o *scanner* de código de barras e confirmar pressionando **[OK]**.
11. Para o registo das amostras e dos tubos de armazenamento pressionar **[Yes]** e seguir as instruções no ecrã para inserir os códigos de barras correspondentes.
12. Preparar o *Chemagic Tip & Tube Rack* com os materiais necessários. Colocar um tubo de reação de 0.75mL vazio para o **Elution Buffer** (posição 1), um tubo de reação de 0.75mL contendo 150µL de **Magnetic Beads** (posição 2) e uma **Disposable Tip** (posição 3) (Figura 2. A). Colocar os materiais para cada amostra nas posições correspondentes às das amostras.

Nota: Agitar o recipiente das **Magnetic Beads** vigorosamente até estarem completamente ressuspensas. Uma ressuspensão incompleta pode causar uma diminuição da quantidade de ácidos nucleicos extraídos.
13. Adicionar 250µL de sangue a cada poço da *Deep Well Plate* (Figura 2. A).
14. Adicionar 10µL de **Protease** a cada poço preenchido com a amostra de sangue.

Nota: Uma incubação do sangue com a **Protease** superior a 5 minutos pode baixar a quantidade e diminuir a pureza do DNA extraído. Depois de adicionar a **Protease**, continuar imediatamente com os passos seguintes do protocolo.

15. Uma informação no ecrã indica as posições das amostras anteriormente seleccionadas. Assegurar que as posições das amostras na *Deep Well Plate* correspondem às posições seleccionadas. Colocar a *Deep Well Plate* na sua posição padrão no interior do sistema e pressionar **[Continue]**.
16. Colocar o *Chemagic Tip & Tube Rack* na sua posição padrão no interior do sistema. Verificar que as placas a *Deep Well Plate* e o *Chemagic Tip & Tube Rack* estão bem ajustados e trancá-los fechando o trinco de segurança.
17. Fechar a porta frontal e iniciar o processo automático pressionando **[Start]** imediatamente.

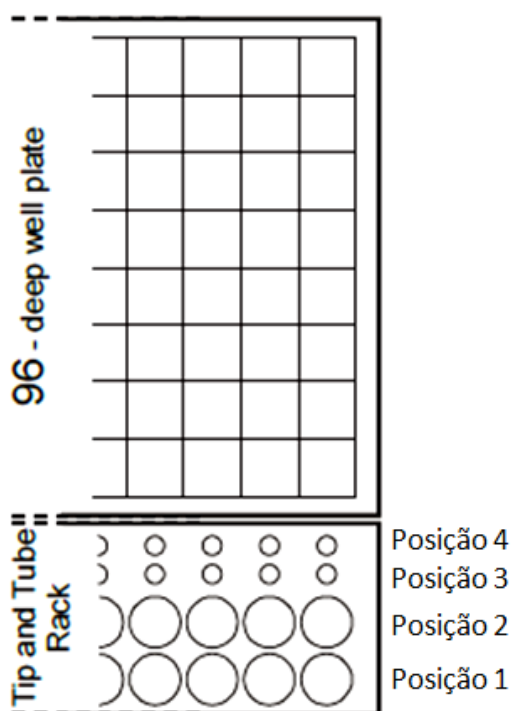


Figura 2. A – Esquema e posições padrão da *Deep Well Plate* e do *Chemagic Tip & Tube Rack*.

Anexo 3:

Protocolo *array*-CGH – *Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis* (Agilent Technologies)

Ligar o forno de hibridação 24h antes da utilização.

1. Quantificação do DNA genómico – NanoDrop

1.1. Analisar a concentração de DNA (Tabela 3. A).

Tabela 3. A – Valores de referência após quantificação do DNA no NanoDrop.

A_{260}/A_{280}	1.8 a 2.0	Ausência de proteínas contaminantes gDNA de alta qualidade
A_{260}/A_{230}	>1.0	Ausência de fenois ou outros contaminantes DNA puro

2. Preparação das amostras

Quantidade de gDNA por amostra – **CGH Microarray, 4x180K**: 1µg de gDNA em 26µL

2.1. Preparar a amostra de DNA em *eppendorfs* 0.5mL:

- 4 amostras teste
- 4 amostras controlo

3. Marcação fluorescente do gDNA

3.1. Adicionar 5µL de **Random Primer** (-20°C) a cada tubo.

Volume total: 31µL.

3.2. Misturar por *up and down*.

3.3. No termociclador: 98°C – 10 minutos.

3.4. Transferir diretamente para gelo.

3.5. Centrifugar durante 1 minuto a 6000g.

3.6. Preparar a *Master Mix* de marcação a -20°C (uma para cada cianina) (Tabela 3. B).

Tabela 3. B – Reagentes e respetivas quantidades necessárias na preparação da *Master Mix* de marcação.

Reagente	Por reação (μL)	x4 (μL) (incluindo excessos)	x8 (μL) (incluindo excessos)
5x Reaction Buffer	10	42.50	85
10x dNTPs	5	21.25	42.5
Cy3 (verde) ou Cy5 (vermelho)	3	12.75	25.5
Exo (-) Klenow	1	4.25	8.5
Volume total	19	80.75	161.5

3.7. Adicionar, fazendo *up and down*, 19μL da respetiva *Master Mix* a cada tubo de reação contendo as amostras teste e controlo. Volume total: 50μL.

3.8. No termociclador, incubar as amostras:

- 37°C – 2h
- 65°C – 10 minutos
- 4°C – *hold*

As amostras podem ser congeladas a -20°C até 1 mês, no escuro.

4. Purificação do gDNA marcado

4.1. Centrifugar durante 1 minuto a 6000g.

4.2. Para cada amostra preparar uma coluna colocada num *eppendorf (kit)* e um *eppendorf (kit)*, devidamente identificados.

4.3. Adicionar 430μL de **TE** (ph 8) a cada coluna.

4.4. Transferir toda a amostra para a coluna.

4.5. Centrifugar durante 10 minutos a 14000g.

4.6. Rejeitar o eluído e colocar de novo a coluna no respetivo *eppendorf*.

4.7. Adicionar 480μL de **TE** (ph 8) a cada coluna.

4.8. Centrifugar durante 10 minutos a 14000g.

4.9. Inverter a coluna para o novo *eppendorf*.

4.10. Centrifugar durante 1 minuto a 1000g, para recolher a amostra purificada. O volume ideal deverá ser aproximadamente 21μL.

4.11. Colocar os tubos no gelo durante 5 minutos.

4.12. Fazer *up and down* 10x e retirar 1μL de cada amostra para quantificação no **NanoDrop**.

Determinar *Yield*, *Degree of Labeling* e *Specific Activity*:

- No menu principal, selecionar *MicroArray Measurement* e em *Sample Type* selecionar *DNA-50*.
- Pipetar 1µL de **TE** (ph8) para calibrar o aparelho.
- Pipetar 1µL da amostra de DNA marcado para quantificação. Determinar a absorvância a A_{260nm} (DNA), A_{550nm} (cianina 3) e A_{650nm} (cianina 5).
- Calcular:

$$\text{Degree of Labeling} = \frac{340 \times \text{pmol per } \mu\text{L dye}}{\text{ng per } \mu\text{L genomic DNA} \times 1000} \times 100\%$$

$$\text{Specific Activity (pmol dye per } \mu\text{g genomic DNA)} = \frac{\text{pmol per } \mu\text{L dye}}{\mu\text{g per } \mu\text{L genomic DNA}}$$

Specific Activity é o *Degree of Labeling* dividido por 0.034.

Determinar a concentração de gDNA (ng/µL) para cada amostra.

$$\text{Yield } (\mu\text{g}) = \frac{\text{DNA concentration (ng/}\mu\text{L)} \times \text{Sample Volume } (\mu\text{L})}{1000 \text{ ng/}\mu\text{g}}$$

Verificar os valores esperados após a marcação de purificação do gDNA (Tabela 3. C).

Tabela 3. C – Valores esperados de Yield e Specific Activity após marcação e purificação do gDNA.

<i>Yield</i> (µg)	<i>Specific Activity</i> – amostra marcada com cianina 3 (pmol/µg)	<i>Specific Activity</i> – amostra marcada com cianina 5 (pmol/µg)
9 a 12	25 a 40	20 a 35

4.13. Juntar cada par de amostras (amostra teste e amostra controlo) em *eppendorfs* 0.5mL.

As amostras podem ser congeladas a -20°C até 1 mês, no escuro.

5. Preparação do DNA marcado

5.1. Preparar o 10x Blocking Agent:

- Adicionar 1.350µL de **Nuclease-free water** ao tubo que contém o **10x aCGH Blocking Agent** liofilizado.

- Deixar à temperatura ambiente durante 60 minutos.
- Distribuir por alíquotas e armazenar a -20°C.

5.2. Preparar a *Master Mix* de hibridação a -20°C (Tabela 3. D).

Tabela 3. D – Reagentes e respectivas quantidades necessárias na preparação da *Master Mix* de hibridação.

Reagente	Por reação (μL)	x5 (μL)	x9 (μL)
Cot-1 DNA (1,0 mg/mL)	5	25	45
10x aCGH Blocking Agent	11	55	99
2x HI-RPM Hybridization buffer	55	275	495
Volume total	71	355	639

5.3. Adicionar 71μL da *Master Mix* a cada amostra e misturar fazendo *up and down* em cada tubo.

5.4. No termociclador programar dois blocos:

- 98°C – 3 minutos e transferir imediatamente para
- 37°C – 30 minutos

5.5. Centrifugar durante 1 minuto a 6000g.

6. Hibridação

6.1. Preparar o *gasket slide* e colocar na base da câmara de hibridação (com a face *Agilent* voltada para cima e do lado esquerdo) (Figura 3. A – 1, 2).

6.2. Dispensar 100μL de cada amostra para o respetivo poço (Figura 3. A – 3).

6.3. Colocar o *array* sobre o *gasket slide* (face *Agilent* com face *Agilent*), suavemente e de uma só vez (Figura 3. A – 4).

6.4. Colocar a parte superior da câmara de hibridação e a proteção, apertar com o indicador até travar e dar ¼ de volta (Figura 3. A – 5, 6, 7).

6.5. Girar devagar em movimento circular, verificando que a bolha de ar se desloca e que todo o poço fica preenchido com a amostra (Figura 3. A – 8).

6.6. Colocar a câmara no forno de hibridação a 67°C, a 20rpm durante 24h.

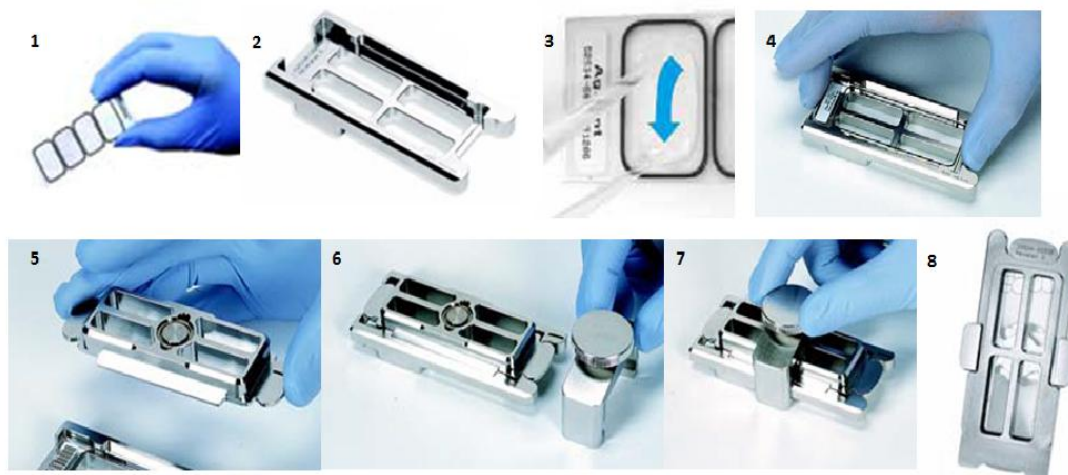


Figura 3. A – 1: *Gasket slide* de quatro poços. **2:** Base da câmara de hibridação onde se coloca o *gasket slide*. **3:** Colocação das amostras no respetivo poço do *gasket slide*. **4:** Colocação do array sobre o *gasket slide*. **5, 6, 7:** Colocação da parte superior da câmara de hibridação e da proteção. **8:** Câmara de hibridação montada e verificação das bolhas de ar.

7. Lavagens

7.1. Preparar as soluções de lavagem:

- *Coplin* 1: colocar a solução de lavagem 1 (**Oligo aCGH Wash Buffer 1**).
- *Coplin* 2: colocar a solução de lavagem 1 (**Oligo aCGH Wash Buffer 1**), com um magneto no fundo e colocar no agitador à temperatura ambiente (agitação no mínimo).
- *Coplin* 3: colocar a solução de lavagem 2 (**Oligo aCGH Wash Buffer 2**), com um magneto no fundo e colocar no agitador a 37°C (agitação no mínimo).

7.2. Mergulhar o *array* no *coplin* 1 e, com a ajuda da pinça, destacá-lo do *gasket slide* pelo espaço entre ambos. O *gasket slide* deverá cair no fundo. Agitar suavemente e transferir o *array* para o *coplin* 2.

7.3. Incubar no *coplin* 2 durante 5 minutos.

7.4. Incubar no *coplin* 3 durante 1 minuto.

7.5. Retirar o *array* levantando muito lentamente e inclinar ligeiramente para a direita e para baixo.

7.6. Colocar o *array* no *slide holder* com a face *Agilent* voltada para cima (Figura 3. B).

7.7. Colocar o *slide holder* no *scan*.



Figura 3. B – *Slide holder* com array.

Anexo 4

Protocolo qPCR - *TaqMan*® *Copy Number Assays* (Applied Biosystems)

1. Preparação das amostras de DNA genómico

1.1. Quantificar as amostras no **NanoDrop**. O quociente $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ deve ser superior a 1.7.

1.2. Diluir cada amostra de DNA para 5ng/μL usando **nuclease-free water**, no sentido de obter uma solução *stock* de 5X.

Nota: Deve-se utilizar a mesma concentração de gDNA para todas as amostras que estão a ser testadas no mesmo ensaio.

2. Desenho da experiência

2.1. Desenhar a experiência, esquematizando a placa a utilizar. Utilizam-se sempre três réplicas de cada amostra, um controlo negativo que não contém DNA e uma amostra de referência (controlo masculino/feminino) com número de cópias conhecido para o gene alvo.

Nota: Neste procedimento utiliza-se sempre um controlo feminino e um controlo masculino, pois estudam-se vários elementos da mesma família e a utilização dos dois controlos pode ajudar a encontrar alterações no número de cópias em algum deles.

3. Configuração do *software* do aparelho

3.1. Criar uma experiência/placa no *software* StepOne™.

3.2. Identificar as amostras em cada poço da placa de reação.

- Identificar os poços que contêm DNA e os que contêm o controlo negativo.
- Em cada poço, aplicar um nome à amostra e ao gene, incluindo a informação do marcador (*reporter* e *quencher*). Aplicar o mesmo nome a todas as réplicas da mesma amostra, para que o *software* analise os dados em conjunto.

Nota: Configuração das informações dos marcadores:

TaqMan® Copy Number Assay: reporter → FAM; Quencher → NFQ-MGB

TaqMan® Copy Number Reference Assay: reporter → VIC; Quencher → TAMRA

- Definir o gene da RNase P (**TaqMan® Copy Number Reference Assay**) como controlo endógeno e o controlo feminino/masculino como amostra de referência.

3.3. Definir o volume final como 20µL.

4. Preparação das reações

4.1. Calcular o volume necessário de cada reagente para cada reação, de acordo com o número de reações a realizar e o número de poços a utilizar (incluir excessos nos cálculos). Ter em conta os volumes necessários por poço (Tabela 4. A).

Tabela 4. A – Reagentes e respetivos volumes necessários por poço.

Reagente	Volume por poço (µL)
2X TaqMan® Genotyping Master Mix	10,0
TaqMan® Copy Number Assay, 20X working stock	1,0
TaqMan® Copy Number Reference Assay, 20X	1,0
Nuclease-free water	4,0
gDNA (5ng/µL)	4,0
Volume total	20,0

A **TaqMan® Genotyping Master Mix** é composta pelos reagentes necessários a uma reação de PCR: **AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)** e **dNTPs**. O **TaqMan® Copy Number Assay** contém dois *primers* e uma sonda marcada com corante fluorescente para detetar a sequência de DNA/gene alvo. O **TaqMan® Copy Number Reference Assay** contém igualmente dois *primers* e uma sonda marcada, mas para detetar uma sequência de DNA de referência. Esta sequência de referência é uma sequência que se sabe que possui sempre duas cópias num genoma diploide e, neste procedimento, é utilizado o gene humano RNase P.

4.2. Descongelar totalmente o **TaqMan® Copy Number Assay** e o **TaqMan® Copy Number Reference Assay**, agitar no vortex e centrifugar brevemente.

4.3. Agitar a **TaqMan® Genotyping Master Mix** para misturar os reagentes.

4.4. Colocar o volume necessário dos reagentes para a reação em tubos de microcentrifuga.

4.5. Inverter os tubos para misturar os componentes e centrifugar brevemente.

- 4.6. Pipetar a mistura de reação nos poços da placa de reação (placa de 96 poços).
Pipetar 16µL por poço.
- 4.7. Agitar no vortex as amostras de gDNA anteriormente preparadas, a 5ng/µL.
- 4.8. Adicionar 4µL de gDNA a cada poço.
- 4.9. Selar bem a placa com adesivo óptico transparente.
- 4.10. Centrifugar brevemente a placa numa centrífuga de placas.
- 4.11. Observar todos os poços para assegurar um volume uniforme em todos eles.

5. Corrida das reações

- 5.1. Introduzir a placa de reação no aparelho de qPCR (StepOnePlus™ - Real Time PCR system).
- 5.2. Definir os parâmetros da reação (Tabela 4. B).

Tabela 4. B – Parâmetros da reação de qPCR.

Ciclos	Temperatura	Tempo
<i>Hold</i>	95°C	10 minutos
40 ciclos	95°C	15 segundos
	60°C	60 segundos

6. Análise dos resultados

- 6.1. No *software* StepOne™ abrir a janela *Analysis Settings* e definir as seguintes configurações:
 - *Manual C_T threshold* – 0.2
 - *Autobaseline* – On
- 6.2. Aplicar as definições e fechar a janela.
- 6.3. Analisar a experiência.
- 6.4. Rever os dados analisados e resolver alguns problemas indicados pelas bandeiras.
Verificar as curvas de amplificação para:
 - O **Reference Assay** em todas as amostras tem uma fase de amplificação distinta e linear.
 - O **Copy Number Assay** na maioria das amostras tem uma fase de amplificação distinta e linear.
 - Rever se são exibidas algumas bandeiras indicativas de erros e/ou qualidade do ensaio e, se sim, rever os dados da reação para as amostras associadas.

6.5. Depois de analisar os dados da reação no *software* StepOne™, exportar os resultados em formato .txt para serem analisados no *software* CopyCaller™.

6.6. No *software* CopyCaller™:

- Importar o ficheiro exportado do *software* StepOne™.
- Definir o controlo feminino/masculino como tendo 2 cópias do gene alvo (ter em atenção se o gene se localiza num autossoma ou num cromossoma sexual).
- Analisar cada gene para determinar o número de cópias do gene alvo em cada amostra, relativamente ao controlo feminino/masculino.

Anexo 5:

Tabela A – Alterações patogénicas (I) e provavelmente patogénicas (II) encontradas nos 26 pacientes, incluindo a citobanda, região cromossómica, dimensão, origem e genes envolvidos pela alteração, bem como a indicação clínica de cada paciente.

Alterações patogénicas (I)							
Caso	Alteração	Citobanda	Região cromossómica (GRCh37)	Dimensão (kb)	Genes envolvidos	Indicação clínica	Origem
Caso 1	Deleção	6q25.3	157,181,785 – 157,400,654	219	<i>ARID1B</i>	Atraso mental e síndrome polimalformativa	Não determinado (ND)
Caso 2	Deleção	15q11.2	22,765,628 – 23,208,901	443	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1 e WHAMML1	Défice cognitivo, sem dismorfias. Irmão com dificuldades de aprendizagem	Herdada
Caso 3	Duplicação	15q11.2	22,815,306 – 23,059,073	244	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2 e NIPA1	Défice cognitivo, epilepsia e pé boto	ND
Caso 4	Duplicação	17q12	34,817,422 – 36,209,228	1392	PIGW, GGNBP2, LHX1, AATF, ACACA, DUSP14, DDX52, HNF1B, ZNHIT3, MYO19, DHRS11, MRM1, MIR2909, C17orf78, TADA2A, SYNRG e LOC284100	Défice cognitivo, sem dismorfias	Herdada
Caso 5	Deleção	17q12	34,450,405 – 36,243,028	1793	TBC1D3B, CCL3L1, CCL4L2, TBC1D3C, TBC1D3H, TBC1D3G, PIGW, GGNBP2, LHX1, AATF, ACACA, DUSP14, DDX52, HNF1B, CCL3L3, CCL4L1, ZNHIT3, MYO19, DHRS11, MRM1, MIR2909, C17orf78, TADA2A, SYNRG e LOC284100	Défice cognitivo	ND
Caso 6	Deleção	15q26.2qter	97,689,238 – 102,399,819	4711	LOC91948, ARDC4, FAM169B, IGF1R, PGPEP1L, SYNM, TTC23, LRRC28, MEF2A, LYSDM4, DNMT1P46, ADAMTS17, FLJ42289, LASS3, LINS, ASB7, ALDH1A3, LRRK1, CHSY1, SELS, SNRPA1, PCSK6, TM2D3, TARSL2, OR4F6, OR4F15 e GPCRLTM7	Atraso cognitivo, baixa estatura, fácies sindrómica	ND
Caso 7	Duplicação	8p23.1-pter	176,814 – 6,939,296	6762	FBXO25, DLGAP2, CLN8, ARHGEF10, MYOM2, CSMD1, MCPH1, ANGPT2, DEFB1, DEFA6, DEFA4, DEFA1, DEFA5, RPL23AP53, ZNF596, C8orf42, ERICH1, LOC286083, MIR596, KBTBD11, AGPAT5, XKR5, DEFA10P, DEFA1B, DEFT1P, DEFT1P2 e DEFA3	Síndrome dismórfica com défice cognitivo, CIV (Comunicação Interventricular) e baixa estatura	ND
	Deleção	11q24.2-qter	124,518,113 – 134,927,114	10409	NRGN, ROBO3, ROBO4, HEPN1, HEPACAM, PKNOX2, FEZ1, EI24, CHEK1, ACRV1, HYLS1, SRPR, TIRAP, KIRREL3, ETS1, FLI1, KCNJ1, KCNJ5, BARX2, NFRKB, APLP2, ST14,		ND

					ADAMTS8, NTM, OPCML, SPATA19, JAM3, VPS26B, ACAD8, B3GAT1, SIAE, SPA17, VSIG2, ESAM, C11orf61, CCDC15, SLC37A2, TMEM218, STT3A, PATE1, PATE2, PATE3, PATE4, PUS3, DDX25, CDON, RPUSD4, FAM118B, FOXRED1, DCPS, FLJ39051, ST3GAL4, MIR3167, C11orf45, TP53AIP1, ARHGAP32, TMEM45B, PRDM10, NCRNA00167, ZBTB44, ADAMTS15, SNX19, LOC283174, IGSF9B, LOC100128239, NCAPD3, THYN1, GLB1L3, GLB1L2 e LOC283177		
Caso 8	Deleção	22q11.21	18,894,835 – 21,464,119	2569	DGCR6, PRODH, DGCR2, TSSK2, SLC25A1, CLTCL1, HIRA, UFD1L, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, TXNRD2, COMT, ARVCF, DGCR8, TRMT2A, ZDHHC8, RTN4R, DGCR6L, RIMBP3, ZNF74, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, LZTR1, SLC7A4, BCRP2, DGCR5, DGCR9, DGCR10, DGCR11, DGCR14, GSC2, MRPL40, C22orf39, CDC45, LOC150185, SEPT5GP1BB, C22orf29, C22orf25, MIR185, MIR3618, MIR1306, RANBP1, LOC150197, MIR1286, PI4KAP1, SCARF2, KLHL22, MED15, POM121L4P, TMEM191A, AIFM3, THAP7, FLJ39582, MGC16703, P2RX6, P2RX6P e LOC400891	Défice cognitivo e escoliose	ND
Caso 9	Trissomia em mosaico do cromossoma 8	8p23.3q24.3	161,472 – 146,294,098	Todo o cromossoma 8	Todos os genes do cromossoma 8	Hábito marfanoide (membros compridos e articulações laxas) com debilidade mental	ND
Caso 10	Deleção	1q21.1q21.2	145,818,702 – 149,378,266	3560	GPR89A, FMO5, CHD1L, BCL9, GJA5, GJA8, GPR89B, NBPf15, FCGR1C, GPR89C, PDZK1P1, NBPf11, NBPf24, LOC728989, PRKAB2, PDIA3P, ACP6, FLJ39739, PP1AL4B, PP1AL4A, NBPf14, PP1AL4D, PP1AL4F, NBPf16, PP1AL4E, LOC645166 e LOC388692	Défice cognitivo, face dismórfica e pescoço longo	ND
	Deleção	16p11.2	29,652,999 – 30,198,600	546	SPN, QPRT, KIF22, MAZ, C16orf53, MVP, KCTD13, DOC2A, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, MAPK3, C16orf54, ZG16, PRRT2, CDIPT, LOC440356, SEZ6L2, ASPHD1, TMEM219, TAOK2, HIRIP3, INO80E, C16orf92, FAM57B, GPD3, LOC100271831 e CORO1A		ND
Caso 11	Deleção	16p11.2	29,652,999 – 30,198,600	546	SPN, QPRT, KIF22, MAZ, C16orf53, MVP, KCTD13, DOC2A, ALDOA,	Défice cognitivo, com um QI de 69 e sindactilia dos 2º e 3º dedos dos pés	ND

					PPP4C, TBX6, YPEL3, MAPK3, C16orf54, ZG16, PRRT2, CDIPT, LOC440356, SEZ6L2, ASPHD1, TMEM219, TAOK2, HIRIP3, INO80E, C16orf92, FAM57B, GPD3, LOC100271831 e CORO1A		
Caso 12	Deleção	16p11.2	29,133,676 – 30,198,600	1065	SULT1A3, SPN, QPRT, KIF22, MAZ, C16orf53, MVP, KCTD13, DOC2A, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, MAPK3, RUNDC2C, LOC606724, BOLA2, BOLA2B, SLX1A, SLX1B, SLX1A-SLX1B, SULT1A4, SULT1A4, SULT1A3, LOC388242, LOC613038, LOC440354, SLC7A5P1, C16orf54, ZG16, PRRT2, CDIPT, LOC440356, SEZ6L2, ASPHD1, TMEM219, TAOK2, HIRIP3, INO80E, C16orf92, FAM57B GPD3, LOC100271831 e CORO1A	Défice cognitivo. Irmão com atraso global de desenvolvimento, polifagia, obesidade difusa, estatura elevada e provável hipogonadismo	Herdada
Caso 13	Duplicação	17p11.2	16,757,564 – 20,463,361	3706	TNFRSF13B, MPRIP, FLCN, COPS3, NT5M, MED9, RASD1, RAI1, SREBF1, ATPAF2, DRG2, MYO15A, LLGL1, FLII, TOP3A, SHMT1, FBXW10, PRPSAP2, EPN2, MAPK7, MFAP4, SLC47A1, ALDH3A2, SLC47A2, ALDH3A1, AKAP10, PLD6, PEMT, SMCR5, MIR33B, TOM1L2, LRRC48, C17orf39, ALKBH5, SMCR7, SMCR8, EVPLL, LOC339240, LGALS9C, LOC220594, FAM106A, CCDC144B, TBC1D28, ZNF286B, FOXO3B, TRIM16L, FAM18B1, SLC5A10, FAM83G, GRAP, GRAPL, B9D1, MIR1180, RNF112, SNORA59B, SNORA59A, ULK2, SPECC1, CCDC144C, LGALS9B e KRT16P3	Défice cognitivo e uma cardiopatia congénita (estenose aórtica valvular)	ND
Caso 14	Deleção	7q11.23	75,160,961 – 76,214,077	1053	HIP1, CCL26, CCL24, POR, MDH2, HSPB1, YWHAG, SRCRB4D, ZP3, UPK3B, RHBDD2, SNORA14A, TMEM120A, STYXL1, SRRM3, DTX2, FDPSL2A e LOC100133091	Défice cognitivo, macrocefalia e dismorfias minor	ND
Caso 15	Duplicação	7q11.23	74,090,390 – 76,214,077	2124	GTF2I, NCF1, TRIM74, TRIM73, HIP1, CCL26, CCL24, POR, MDH2, HSPB1, YWHAG, SRCRB4D, ZP3, UPK3B, GTF2IRD2, STAG3L2, PMS2P5, GATSL1, WBSR16, GTF2IRD2B, NCF1C, LOC100093631, GTF2IP1, GATSL2, SPDYE8P, PMS2L2, STAG3L1, NSUN5P1, POM121C, SPDYE5, PMS2P3, RHBDD2, SNORA14A, TMEM120A, STYXL1, SRRM3, DTX2, FDPSL2A e LOC100133091	Défice cognitivo, estrabismo e insensibilidade à dor	ND

Alterações provavelmente patogénicas (II)							
Caso	Alteração	Citobanda	Região cromossómica (GRCh37)	Dimensão (kb)	Genes envolvidos	Indicação clínica	Origem
Caso 16	Deleção	1q43	239,855,264 – 239,912,160	57	CHRM3	Défice cognitivo, antecedentes de hipotonia e perturbação da linguagem expressiva	ND
Caso 17	Deleção	1q43	237,381,873 – 237,497,031	115	RYR2	Défice cognitivo, epilepsia, alteração dos movimentos oculares, hêpato-esplenomegalia, microcefalia, hipotonia, lábio superior fino.	ND
Caso 18	Deleção	2q33.3	207,639,004 – 207,657,132	18	FASTKD2, MIR3130-1 e MIR3130-2	Défice cognitivo, epilepsia mioclónica, displasia dentária e estrabismo	ND
Caso 19	Duplicação	2q33.1	200,119,529 – 200,556,471	437	SATB2 e FLJ32063	Atraso muito grave de desenvolvimento cognitivo, alta estatura, défice de linguagem expressivo, escoliose e estrabismo	Herdada
Caso 20	Deleção	9q33.1	119,501,358 – 119,548,870	48	ASTN2	Défice cognitivo moderado. Pai aparentemente com défice cognitivo importante.	Herdada
Caso 21	Duplicação	16p13.11	14,968,855 – 16,292,235	1323	NPIP, RRN3, NDE1, MYH11, ABCC1, ABCC6, NOMO1, MIR3179-1, MIR3179-2, MIR3179-3, MIR3180-1, MIR3180-3, MIR3180-2, PDXDC1, NTAN1, MIR31804, MPV17L, C16orf45, KIAA0430, MIR484 e FOPNL	Défice cognitivo, <i>pectus excavatum</i> e dismorfias faciais, entre as quais, lábio fino	Herdada
Caso 22	Deleção	16p13.3	6,889,408 – 6,964,191	75	RBFOX1	Défice cognitivo	Herdada
Caso 23	Duplicação	8p21.3	22,222,050 – 22,370,282	148	PPP3CC e SLC39A14	Défice cognitivo e hemiparesia	ND
Casos 24 e 25	Deleção	22q13.33	50,425,989-50,579,476	153	MLC1, MOV10L1e IL17REL	Atraso cognitivo	ND
Caso 26	Duplicação	8p11.23p11.21	37,228,320 – 43,396,776	6168	ERLIN2, PROSC, GPR124, BRF2, RAB11FIP1, ADRB3, EIF4EBP1, ASH2L, STAR, LSM1, PPAPDC1B, WHSC1L1, FGFR1, TACC1, PLEKHA2, HTRA4, ADAM9, ADAM2, IDO1, IDO2, C8orf4, SFRP1, GINS4, AGPAT6, NKX63, ANK1, MYST3, PLAT, IKBKB, POLB, DKK4, VDAC3, SLC20A2, CHRN3, THAP1, HOOK3, FNTA, HGSNAT, ZNF703, LOC728024, GOT1L1, BAG4, DDHD2, LETM2, C8orf86, RNF5P1, TM2D2, ADAM32, ADAM5P, ADAM3A, ADAM18, ZMAT4, GOLGA7, MIR486, AP3M2, C8orf40, CHRNA6, RNF170, SGK196 e POTE4	Défice cognitivo. Presença de três cromossomas marcadores no cariótipo	ND
	Duplicação	10p11.21p11.1	35,841,635-39,076,591	3235	CCNY, GJD4, FZD8, ANKRD30A, ZNF25, ZNF33A, MTRNR2L7, ZNF248, ZNF37A, LOC100129055, HSD17B7P2, SEPT7L e LOC399744		ND

